

2.1.2.36. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦♦».

ВВЕДЕНИЕ

Хроматографическими методами называют многостадийные методы разделения, в которых компоненты образца распределяются между двумя фазами – неподвижной и подвижной. Неподвижная фаза может быть твердым веществом, жидкостью, нанесенной на твердый носитель, или гелем. Неподвижная фаза может помещаться в колонку, наноситься в виде тонкого слоя или пленки 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, объем и т.д.

Общая фармакопейная статья содержит определения и расчеты общих параметров и применимых в общем случае требований для пригодности системы. Принципы разделения, описание приборов и методик приведены в следующих общих статьях:

- ♦– Бумажная хроматография (2.1.2.25);
- Тонкослойная хроматография (2.1.2.26);
- Газовая хроматография (2.1.2.27);
- Жидкостная хроматография (2.1.2.28);
- Эксклюзионная хроматография (2.1.2.29).♦

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

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

Хроматограмма – графическое или иное представление зависимости сигнала детектора, концентрации элюируемого вещества или иной величины, используемой для измерения концентрации веществ в элюате, от времени или объема. В идеале хроматограммы представляют собой последовательность гауссовых пиков, расположенных на базовой линии (рисунки 2.1.2.36.-1).

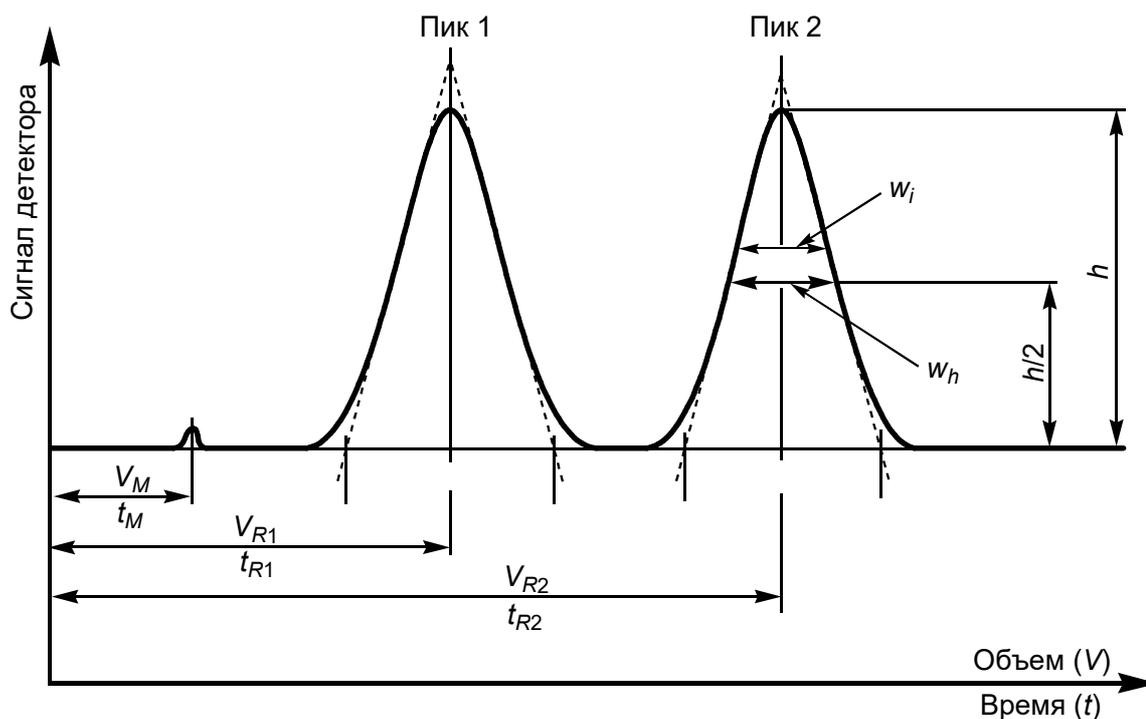


Рисунок 2.1.2.36.-1. Схематическое изображение хроматограммы

- V_M — «мертвый» объем;
- t_M — «мертвое» время;
- V_{R1} — объем удерживания пика 1;
- t_{R1} — время удерживания пика 1;
- V_{R2} — объем 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 (коэффициент распределения) (K_0) — характеристика элюентных свойств компонента в конкретной колонке в эксклюзионной хроматографии, рассчитываемая по формуле:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

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

Объем задержки (D ; V_D) — объем между точкой, при которой происходит смешение элюентов, и входом в колонку (известный также как объем задержки градиента). Объем задержки может быть определен в приведенных ниже условиях хроматографирования.

Условия 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;

Р;

– режим градиентного элюирования:

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

– скорость подвижной фазы: 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 2.1.2.36.-2).

$$D = t_D \times F$$

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

t_G – предварительно установленное время градиента, равное 20 мин;

F – скорость подвижной фазы в миллилитрах в минуту.

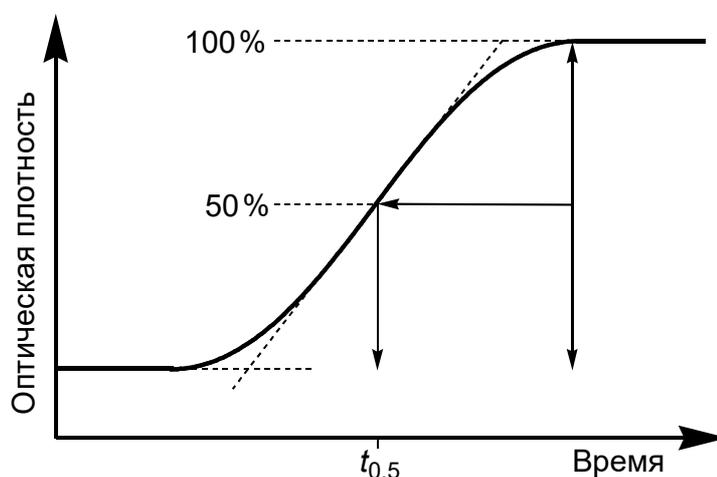


Рисунок 2.1.2.36.-2. Определение объема градиентной задержки

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

«Мертвое» время (t_M) – время, необходимое для элюирования неударживаемого компонента (рисунок 2.1.2.36.-1, шкала базовой линии в минутах или секундах). В эксклюзионной хроматографии используют термин «время удерживания неударживаемого компонента (t_0)».

«Мертвый» объем (V_M) – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования неударживаемого компонента. «Мертвый» объем может быть рассчитан по «мертвому» времени (t_M) и скорости подвижной фазы (F) в миллилитрах в минуту по формуле:

$$V_M = t_M \times F$$

В эксклюзионной хроматографии используют термин «объем удерживания неударживаемого компонента (V_0)».

Пик – участок хроматограммы с записанным сигналом детектора при элюировании из колонки одного компонента (или двух и более неразделенных компонентов).

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

Отношение пик/впадина (p/v) – характеристика, используемая в качестве критерия пригодности хроматографической системы, когда разделение двух пиков до базовой линии не достигнуто (рисунок 2.1.2.36.-3). Отношение пик/впадина рассчитывают по формуле:

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

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.

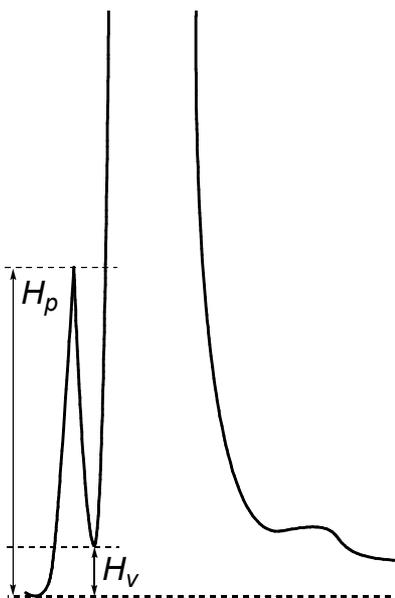


Рисунок 2.1.2.36.-3.

Высота теоретической тарелки (H) (высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)) – характеристика, определяемая, как отношение длины колонки (L), в микрометрах, к числу теоретических тарелок (N).

$$H = \frac{L}{N}$$

Число теоретических тарелок (N) – характеристика эффективности (кажущейся эффективности) колонки. Число теоретических тарелок может быть рассчитано по данным, полученным в зависимости от методики как при изотермическом, изократическом режиме, так и режиме постоянной плотности, по формуле, в которой величины t_R и w_h должны быть выражены в одинаковых единицах:

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

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

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

Приведенная высота теоретической тарелки (h) – характеристика, определяемая, как отношение высоты тарелки (H) в микрометрах к диаметру частицы (d_p) в микрометрах.

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Относительное замедление (R_{rel}) – характеристика, используемая в планарной хроматографии и рассчитываемая, как отношение расстояний, которые прошли пятна определяемого компонента и компонента сравнения (рисунок 2.1.2.36.-4).

$$R_{rel} = \frac{b}{c}$$

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

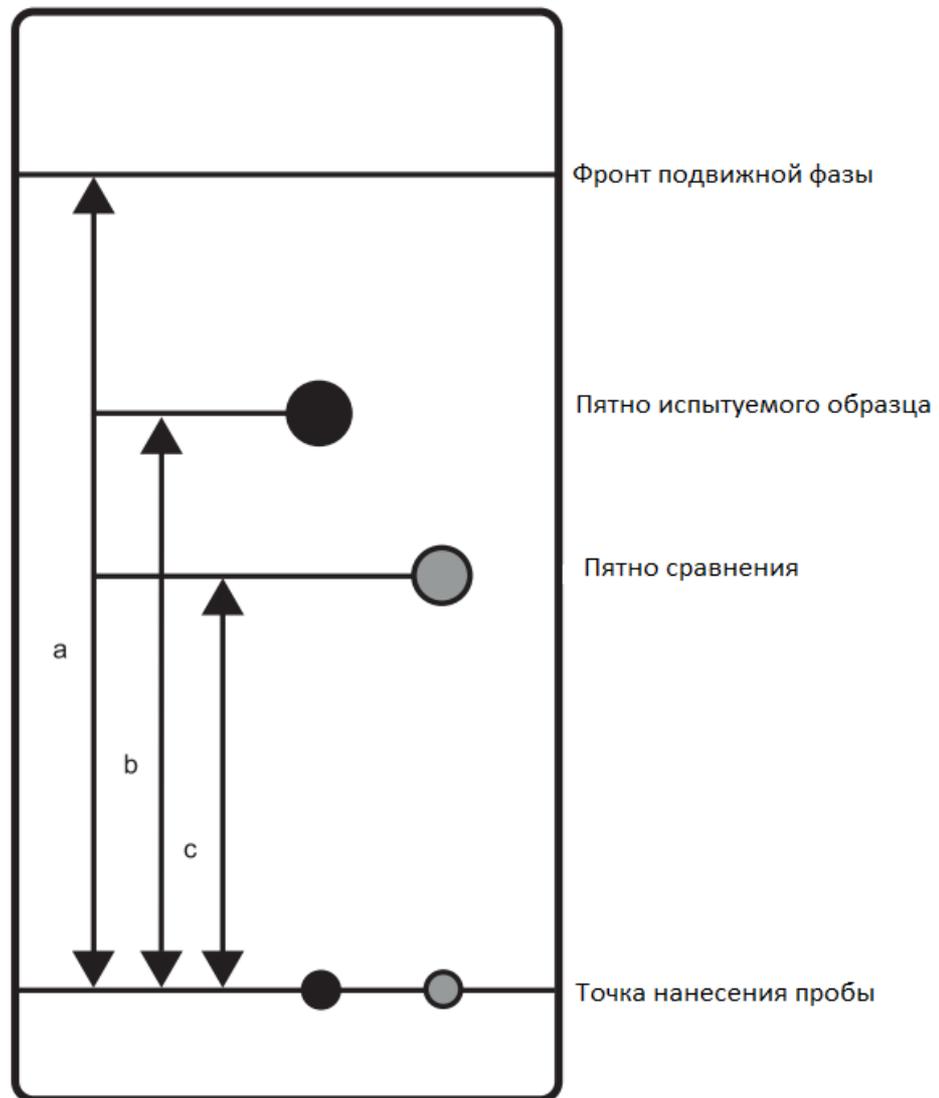


Рисунок 2.1.2.36.-4.

Относительное удерживание (r) – характеристика, определяемая по формуле:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

где: t_{Ri} – время удерживания определяемого пика;
 t_{Rst} – время удерживания пика сравнения (обычно пик, соответствующий испытуемому веществу);
 t_M – «мертвое» время.

Неоткорректированное относительное удерживание (r_G) – характеристика, определяемая по формуле:

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

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

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

Разрешение (R_s) – характеристика степени разделения пиков двух компонентов (рисунок 2.1.2.36.-1), которая может быть рассчитана по формуле:

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

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 планарной хроматографии, проводимой с использованием денситометрии, вместо времен удерживания используют пройденные расстояния. Разрешение между пиками двух компонентов может быть рассчитано по формуле:

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

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.

Коэффициент замедления (R_F) (известный также как фактор удерживания (R_f)) – характеристика, используемая в планарной хроматографии, представляющая собой отношение расстояния от точки нанесения пробы до центра пятна к расстоянию, пройденному в то же время фронтом растворителя от точки нанесения пробы (рисунок 2.1.2.36.-4):

$$R_F = \frac{b}{a}$$

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

Коэффициент удерживания (k) (известный также как коэффициент распределения масс (D_m) или коэффициент емкости (k')) – характеристика, определяемая по формуле:

$$k = \frac{\text{количество вещества в неподвижной фазе}}{\text{количество вещества в подвижной фазе}} = K_C \times \frac{V_S}{V_M}$$

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

Коэффициент удерживания компонента может быть определен из хроматограммы по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

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

Время удерживания (t_R) – время, прошедшее между вводом образца и появлением максимума пика зоны элюируемого образца (рисунок 2.1.2.36.-1, где шкала базовой линии в минутах или секундах).

Объем удерживания (V_R) – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования компонента. Объем удерживания может быть рассчитан по времени удерживания (t_R) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле:

$$V_R = t_R \times F$$

Время удерживания неудерживаемого компонента (t_0) – время удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля в эксклюзионной хроматографии (рисунок 2.1.2.36.-5).

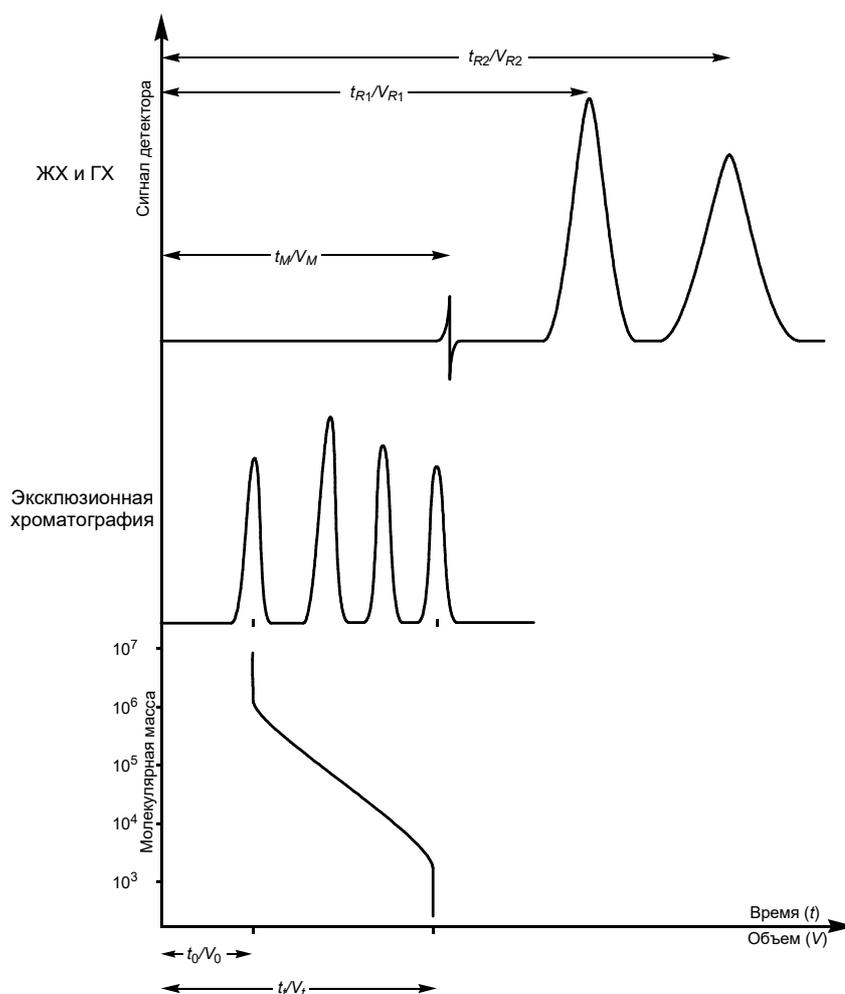


Рисунок 2.1.2.36.-5.

Объем удерживания неудерживаемого компонента (V_0) – объем удерживания компонента, молекулы которого больше, чем размер наибольшей поры геля в эксклюзионной хроматографии. Объем удерживания неудерживаемого компонента может быть рассчитан по времени удерживания неудерживаемого компонента (t_0) и скорости потока (F) в миллилитрах в минуту по формуле:

$$V_0 = t_0 \times F$$

Коэффициент разделения (α) – относительное удерживание, рассчитанное для двух соседних пиков (условно, значение коэффициента разделения всегда больше 1) по формуле:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

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

Отношение сигнал/шум (S/N) – характеристика влияния краткосрочного шума на прецизионность и правильность количественного определения, рассчитываемая по формуле:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

где: H – высота пика (рисунок 2.1.2.36.-6), соответствующего рассматриваемому компоненту, на хроматограмме раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии сигнала, наблюдаемого на протяжении не менее пятикратной ширины пика на половине высоты;

h – уровень шума на хроматограмме, полученной после ввода контрольного раствора (рисунок 2.1.2.36.-7), наблюдаемый в области, равной не менее пятикратной ширины пика на половине высоты пика на хроматограмме раствора сравнения и, по возможности, расположенной симметрично по обе стороны от места возможного обнаружения пика.

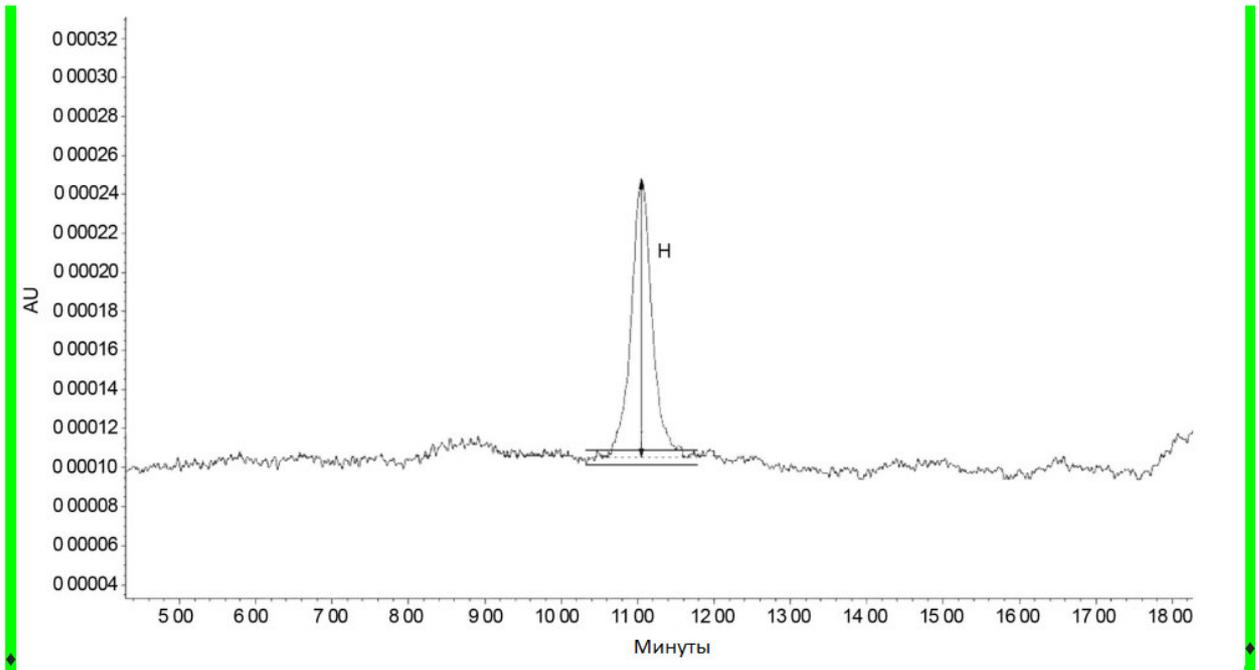


Рисунок 2.1.2.36.-6. Хроматограмма раствора сравнения

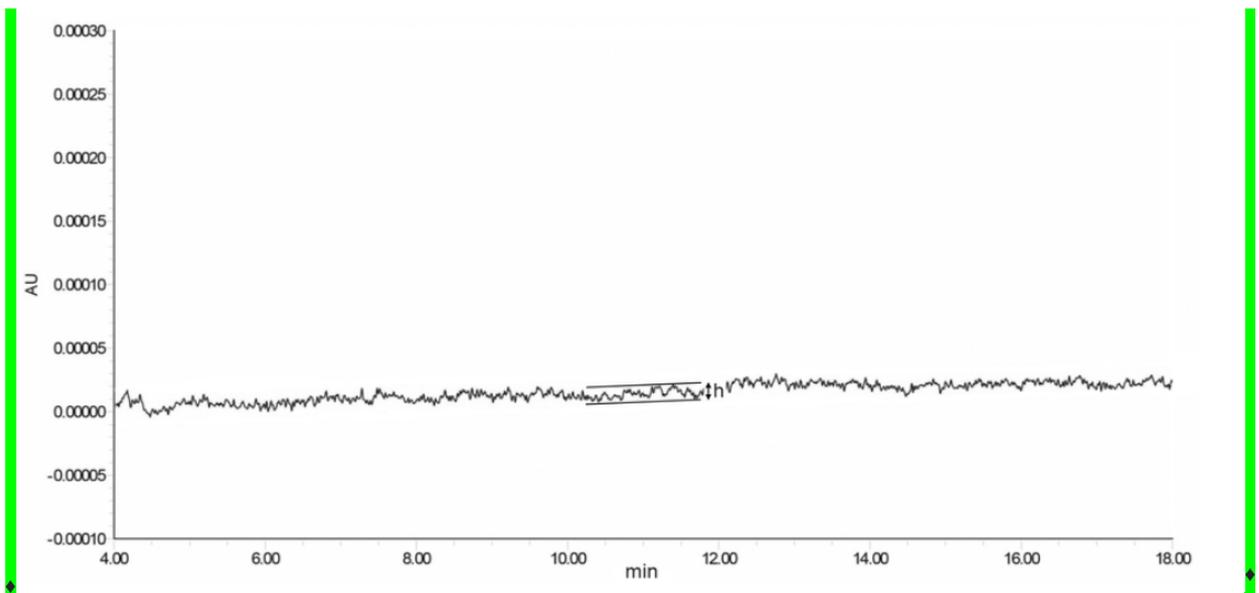


Рисунок 2.2.46.-7. Хроматограмма контрольного раствора

Коэффициент симметрии (A_s) (известный также как коэффициент асимметрии или хвостовой фактор) – характеристика симметричности пика, (рисунок 2.1.2.36.-8), рассчитываемая по формуле:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

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 $A_s > 1,0$, то пик имеет растянутый задний фронт («хвост»); если $A_s < 1,0$, то пик имеет растянутый фронт.

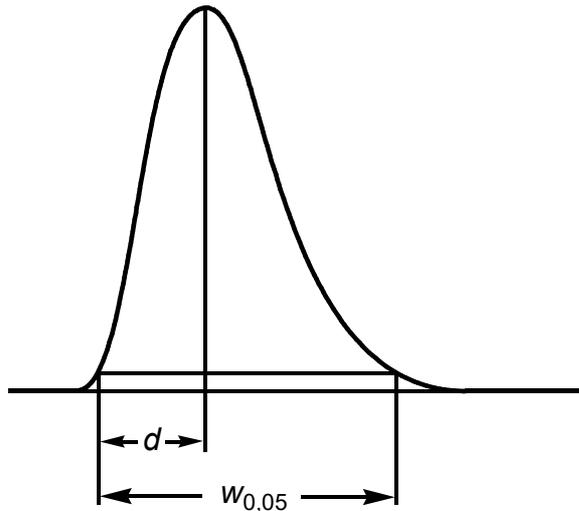


Рисунок 2.1.2.36.-8.

Повторяемость системы – характеристика отклика, выражаемая в виде рассчитанного относительного стандартного отклонения в процентах (RSD , %) последовательных серий измерений для не менее трех введений или нанесений раствора сравнения и рассчитываемая по формуле:

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

где: y_i – индивидуальные значения площади пика, высоты пика или отношения площадей в методе внутреннего стандарта;
 \bar{y} – среднее индивидуальных значений;
 n – число индивидуальных значений.

Общее время подвижной фазы (t_i) – время удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер наименьшей поры геля в эксклюзионной хроматографии (рисунок 2.1.2.36.-5).

Общий объем подвижной фазы (V_i) – объем удерживания компонента, молекулы которого меньше, чем размер наименьшей поры геля в эксклюзионной хроматографии. Полный объем эксклюзии может быть рассчитан по общему времени подвижной фазы (t_i) и скорости потока (F) (в миллилитрах в минуту) по формуле:

$$V_t = t_t \times F$$

ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Данный раздел охватывает только жидкостную и газовую хроматографию.

Различные части применяемого оборудования должны быть квалифицированы и способны к достижению уровня функционирования, необходимого 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 следующие параметры: число теоретических тарелок, коэффициент удерживания (коэффициент распределения масс), повторяемость системы, отношение сигнал/шум, разрешение/отношение пик/впадина и коэффициент симметрии. В случае сложного хроматографического профиля (например, для биотехнологических/биологических лекарственных средств) в частной фармакопейной статье может быть указано в качестве испытания для проверки пригодности хроматографической системы визуальное сравнение профилей.

Факторы, которые могут повлиять на хроматографическое поведение, включают:

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

Времена удерживания и относительные удерживания в частных фармакопейных статьях приведены только для информации, если в частной фармакопейной статье не указано иное. К относительным удерживаниям не применимы критерии приемлемости.

Соответствие требованиям пригодности системы должно выполняться в течение всего процесса хроматографирования. Испытание образца не является приемлемым пока не продемонстрирована пригодность хроматографической системы.

Следующие требования должны выполняться в дополнение к любым другим критериям пригодности системы, указанным в частной фармакопейной статье. Если в частной фармакопейной статье указаны особые требования, тогда они заменяют требования, приведенные в данном разделе.

Повторяемость системы – количественное определение активной фармацевтической субстанции или вспомогательного вещества

При количественном определении активной 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 установленных пределов рассчитывают для серии вводов раствора сравнения ($n=3-6$). Максимально допустимое относительное стандартное отклонение для пика не должно превышать соответствующее значение, приведенное в Таблице 2.1.2.36.-1.

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

- где: K – константа (0,349), полученная из уравнения $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$, в котором $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ соответствует требуемому значению относительного стандартного отклонения (в процентах) при шести повторных вводах пробы для $B = 1,0$;
- B – верхний предел количественного содержания, указанный в определении в частной фармакопейной статье, за вычетом 100 %;
- n – число повторных вводов 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 2.1.2.36.-1. – Максимально допустимое относительное стандартное отклонение (количественное определение)

| B (%) | Число отдельных вводов пробы n | | | |
|---------|---|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | 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 с концентрацией, соответствующей порогу информирования (например, 0,05 %). В качестве альтернативы применяют раствор сравнения, используемый для количественного определения неспецифицированных примесей (например, 0,10 % от концентрации испытуемого раствора) и экстраполируют отношение сигнал/шум для основного пика до порога информирования.

Симметричность пика

Если не указано иное, при проведении испытания или количественного определения, коэффициент симметрии пика, используемого для количественных расчетов, должен составлять 0,8–1,8.

РЕГУЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Описанные условия хроматографирования валидированы при разработке частной фармакопейной статьи.

Ниже приведены пределы, в которых могут корректироваться различные параметры хроматографических испытаний без существенного изменения фармакопейной аналитической методики. Другие, не описанные ниже изменения, требуют повторной валидации методики.

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

Любое регулирование должно быть осуществлено на основании фармакопейной методики.

Если к фармакопейной методике была применена корректировка, то могут потребоваться дополнительные верификационные испытания. Для проверки пригодности

измененной фармакопейной методики оценивают соответствующие аналитические характеристики функционирования, на которые может повлиять изменение.

Если регулирование фармакопейной аналитической методики было проведено в соответствии с требованиями, указанными ниже, регулирование измененной методики без соответствующей повторной валидации неприменимо.

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

Регулирование условий хроматографирования с градиентным элюированием (ВЭЖХ) или программированием температуры (газовая хроматография) является более критичным, чем с изократическим (ВЭЖХ) или изотермическим (газовая хроматография) элюированием, так как может привести к сдвигу пиков на другой уровень градиента или к другим значениям температуры элюирования, и, таким образом, к частичному или полному совместному элюированию соседних пиков или инверсии пика, что в свою очередь может вызвать некорректное отнесение, маскирование пиков или такое их смещение, при котором элюирование будет происходить вне предписанного времени элюирования.

Регулирование некоторых параметров для обеспечения пригодности системы четко указывают в частной фармакопейной статье.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Состав подвижной фазы: содержание компонента-растворителя, присутствующего в меньшем количестве, может быть откорректировано в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) или $\pm 2\%$ (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 число 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: $\pm 0,2$, при отсутствии других указаний.

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

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

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ: ИЗОКРАТИЧЕСКОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Параметры колонки и скорость подвижной фазы

Неподвижная фаза: не допускается изменение заместителя неподвижной фазы (например, не допускается замена C_{18} на C_8); другие физико-химические характеристики неподвижной фазы (например, хроматографическая основа, модификация поверхности и степень химической модификации) должны быть аналогичны; замена колонок с полностью пористыми частицами (*TPP, totally porous particle*) на колонки с поверхностно пористыми частицами (*SPP, superficially porous particle*) допускается 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 таким же или находится в диапазоне от -25% до $+50\%$ от указанного отношения L/dp . При корректировке размера частиц для замены полностью пористых частиц на поверхностно пористые частицы может быть использована другая комбинация L

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

Данные изменения допускаются при выполнении требований пригодности системы и при подтверждении селективности и эквивалентности порядка элюирования контролируемых специфицированных примесей.

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, когда регулирование приводит к меньшей ширине пиков из-за уменьшения размера частиц или внутреннего диаметра, в этой ситуации может потребоваться регулирование для минимизации внеколоночного уширения пика из-за таких факторов, как соединения прибора, объем ячейки детектора, скорость отбора образцов и объем вводимой пробы.

При изменении размера частиц необходимо регулировать скорость подвижной фазы, так как для колонок с меньшим размером частиц необходимы более высокие линейные скорости для обеспечения одинаковой эффективности (определяемая приведенной высотой теоретической тарелки). При изменении диаметра колонки и размера частиц скорость подвижной фазы корректируют по следующей формуле:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

где: F_1 – скорость подвижной фазы, указанная в частной фармакопейной статье, в миллилитрах в минуту;

F_2 – откорректированная скорость подвижной фазы в миллилитрах в минуту;

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

dc_2 – внутренний диаметр используемой колонки в миллиметрах;

dp_1 – размер частиц, указанный в частной 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 подвижной фазы) 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 подвижной фазы).

После регулирования размеров колонки допускается дополнительное изменение скорости подвижной фазы на $\pm 50\%$.

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

Может потребоваться дальнейшее регулирование условий аналитической методики (подвижная фаза, температура, рН и т.д.) в допустимых пределах, указанных в разделах «Пригодность хроматографической системы» и «Регулирование условий хроматографирования» данной общей фармакопейной статьи.

Подвижная фаза

Состав подвижной фазы: содержание компонента-растворителя, присутствующего в меньшем количестве, может быть откорректировано в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) (см. пример, описанный 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 число компонентов подвижной фазы.

pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$, при отсутствии других указаний.

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

Скорость подвижной фазы: при отсутствии изменения размеров колонки допускается регулирование скорости подвижной фазы в пределах ± 50 %.

Длина волны детектора: изменение длины волны не допускается.

Объем вводимой пробы: при изменении размеров колонки для регулирования объема вводимой пробы может быть использована следующая формула:

$$V_{inj_2} = V_{inj_1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

- где: V_{inj_1} – объем вводимой пробы, указанный в частной фармакопейной статье, в микролитрах;
 V_{inj_2} – откорректированный объем вводимой пробы в микролитрах;
 L_1 – длина колонки, указанная в частной фармакопейной статье, в миллиметрах;
 L_2 – новая длина колонки в миллиметрах;
 dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в частной фармакопейной статье, в миллиметрах;
 dc_2 – новый внутренний диаметр колонки в миллиметрах.

Данная формула не применима для замены колонок с полностью пористыми частицами на колонки с поверхностно пористыми частицами.

При отсутствии регулирования размеров колонки объем вводимой пробы может быть изменен при условии, что критерии пригодности системы остаются в установленных пределах приемлемости. При уменьшении объема вводимой пробы следует обратить внимание на предел обнаружения и повторяемость 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

Регулирование условий хроматографирования при градиентном элюировании требует большей осторожности, чем при изократическом элюировании.

Параметры колонки и скорость подвижной фазы

Неподвижная фаза: не допускается изменение заместителя неподвижной фазы (например, не допускается замена C_{18} на C_8); другие физико-химические характеристики неподвижной фазы (например, хроматографическая основа, модификация поверхности и степень химической модификации) должны быть аналогичны; замена колонок с полностью пористыми частицами на колонки с поверхностно пористыми частицами допускается 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 таким же или находится в диапазоне от -25 % до $+50$ % от указанного отношения L/dp . При корректировке размера частиц для замены полностью пористых частиц на поверхностно пористые частицы может быть использована другая комбинация 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 частной фармакопейной статьи.

Эти изменения применимы при условии, что выполняются требования к пригодности системы, и показано, что селективность и порядок элюирования контролируемых специфицированных примесей эквивалентны.

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, когда регулирование приводит к меньшей ширине пиков из-за уменьшения размера частиц или внутреннего диаметра, в этой ситуации может потребоваться регулирование для минимизации внеколоночного уширения пика из-за таких факторов, как соединения прибора, объем ячейки детектора, скорость отбора образцов и объем вводимой пробы.

При изменении размера частиц необходимо регулировать скорость подвижной фазы, так как для колонок с меньшим размером частиц необходимы более высокие линейные скорости для обеспечения одинаковой эффективности (определяемая приведенной высотой теоретической тарелки). При изменении диаметра колонки и размера частиц скорость подвижной фазы корректируют по следующей формуле:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

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

Изменение размеров колонки и, следовательно, объема колонки влияет на объем градиента, который контролирует селективность. Градиенты корректируют в зависимости от объема колонки, изменяя объем градиента пропорционально объему колонки. Это применимо к объему каждого сегмента градиента. Так как объем градиента представляет собой время градиента (t_G), умноженное на скорость подвижной фазы (F), время градиента для каждого сегмента градиента необходимо корректировать для сохранения постоянным отношения объема градиента к объему колонки (выраженному как $L \times dc^2$). Таким образом, новое время градиента (t_{G2}) может быть рассчитано из исходного времени градиента (t_{G1}), скорости (скоростей) подвижной фазы и размеров колонки по формуле:

$$t_{G2} = t_{G1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{L_2 \times dc_2}{L_1 \times dc_1}$$

Таким образом, изменение условий градиентного элюирования состоит из трех этапов:

- (1) регулирование длины колонки и размеров частиц в соответствии с отношением L/dp ;
- (2) регулирование скорости подвижной фазы в соответствии с измененными размером частиц и диаметром колонки;
- (3) регулирование времени градиента каждого сегмента в соответствии с измененными длиной колонки, диаметром и скоростью подвижной фазы.

Пример, приведенный ниже иллюстрирует этот процесс.

Таблица 2.1.2.36.-2. – Пример регулирования для жидкостной хроматографии:
градиентное элюирование

| Изменяемый параметр | Исходные условия | Откорректированные условия | Примечание |
|---|------------------|---------------------------------|--------------------|
| 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 подвижной фазы (F), мл/мин | 2,0 | 0,7 | (2) |
| Коэффициент корректирования градиента (t_{G2}/t_{G1}) | | 0,4 | (3) |
| Градиентные условия | | | |
| B (%) | Время (мин) | Время (мин) | |
| 30 | 0 | 0 | |
| 30 | 3 | $(3 \times 0,4) = 1,2$ | |
| 70 | 13 | $[1,2 + (10 \times 0,4)] = 5,2$ | |
| 30 | 16 | $[5,2 + (3 \times 0,4)] = 6,4$ | |
| (1) увеличение на 11 % в установленных пределах изменения L/dp от – 25 % до + 50 %; | | | |
| (2) рассчитано с использованием $F_2 = F_1 \left[\frac{(dc_2^2 \times dp_1)}{(dc_1^2 \times dp_2)} \right]$; | | | |
| (3) рассчитано с использованием $t_{G2} = t_{G1} \times \left(\frac{F_1}{F_2} \right) \times \left[\frac{(L_2 \times dc_2^2)}{(L_1 \times dc_1^2)} \right]$. | | | |

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

Может понадобиться дальнейшее регулирование условий аналитической методики (подвижная фаза, температура, pH и т.д.) в допустимых пределах, указанных в разделах «Пригодность хроматографической системы» и «Регулирование условий хроматографирования» данной общей фармакопейной статьи.

Подвижная фаза

Состав подвижной фазы/градиент: корректирование состава подвижной фазы и градиента допустимо при следующих условиях:

- выполняются требования пригодности хроматографической системы;
- основной (основные) пик (пики) элюируется в пределах ± 15 % от указанного (указанных) времени(временен) удерживания, полученных в исходных условиях; это требование не применимо, если изменяются размеры колонки;
- состав подвижной фазы и градиент должны быть такими, чтобы первые пики достаточно удерживались, а последние пики – элюировались.

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

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

Если соответствие требованиям пригодности хроматографической системы не может быть достигнуто, зачастую предпочтительным является повторное рассмотрение объема задержки или замена хроматографической колонки.

Объем задержки

Конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, время удерживания или относительное удерживание, описанные в методике, что может обусловлено изменением объема задержки. В частных фармакопейных статьях

как правило включают изократическую стадию до начала программы градиентного элюирования, таким образом может быть возможна адаптация к временным точкам градиента с учетом разницы в объеме 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 частной фармакопейной статье приведен объем задержки, установленный при ее разработке, то временные точки (t , мин), указанные в таблице градиента, могут быть заменены на адаптированные временные точки (t_c , мин), рассчитанные по формуле:

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

где: D – объем задержки в миллилитрах;
 D_0 – объем задержки, использованный при разработке аналитической методики, в миллилитрах;
 F – скорость подвижной фазы в миллилитрах в минуту.

Изократическая стадия, введенная с данной целью, может быть исключена при наличии данных по валидации методики, применяемой без указанной стадии.

Длина волны детектора: изменение не допускается.

Объем вводимой пробы: при изменении размеров колонки для регулирования объема вводимой пробы может быть использована следующая формула:

$$V_{inj_2} = V_{inj_1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

где: V_{inj_1} – объем вводимой пробы, указанный в частной фармакопейной статье, в микролитрах;
 V_{inj_2} – откорректированный объем вводимой пробы в микролитрах;
 L_1 – длина колонки, указанная в частной фармакопейной статье, в миллиметрах;
 L_2 – новая длина колонки в миллиметрах;
 dc_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в частной фармакопейной статье, в миллиметрах;
 dc_2 – новый внутренний диаметр колонки в миллиметрах.

Эта формула может быть не применима при замене колонок с полностью пористыми частицами на колонки с поверхностно пористыми частицами.

Даже в случае полного отсутствия изменений размеров колонки объем вводимой пробы может быть изменен при условии, что критерии пригодности системы остаются в установленных пределах приемлемости. При уменьшении объема вводимой пробы особое внимание необходимо уделять пределу обнаружения и повторяемости сигнала (сигналов) определяемых пиков. Увеличение допускается при условии, что, в частности, линейность и разрешение определяемого пика (пиков) остаются удовлетворительными.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Параметры колонки

Неподвижная фаза:

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

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

Размеры колонки:

- длина: от – 70 % до + 100 %;
- внутренний диаметр: ± 50 %.
- Температура колонки: ± 10 %.

Температурная программа: допускается корректирование температуры, как указано выше; допускается регулирование скоростей подъема температуры и времен выдержки на изотермическом участке до ± 20 %.

Скорость газа-носителя: ± 50 %.

Эти изменения применимы при условии, что выполняются требования к пригодности системы, и показано, что селективность и порядок элюирования контролируемых специфицированных примесей эквивалентны.

Объем вводимой пробы и деление потока: могут быть изменены при подтверждении соответствия критериев пригодности системы установленным пределам приемлемости. При уменьшении объема вводимой пробы или увеличении деления потока особое внимание необходимо уделять пределу обнаружения и повторяемости сигнала (сигналов) определяемого(ых) пика(ов). Увеличение объема вводимой пробы или уменьшение деления потока допускаются при условии, что, в частности, линейность и разрешение определяемого (определяемых) пика (пиков) остаются удовлетворительными.

Температура блока ввода и температура линии подачи образца в условиях статической парофазной системы ввода: ± 10 °C при условии отсутствия разложения или конденсации.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

Метод внешнего стандарта

С использованием калибровочной функции. Готовят несколько растворов сравнения с разными концентрациями стандартного образца анализируемого компонента в диапазоне, где подтвержден линейный отклик, и вводят заданный объем этих растворов сравнения. Используя полученные хроматограммы, строят калибровочную кривую, откладывая площади или высоты пиков 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 частной 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.

С использованием одноточечной калибровки. В соответствии с частной фармакопейной статьей 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, например ввод, должны выполняться при соблюдении постоянных условий.

Метод внутреннего стандарта

С использованием калибровочной функции. При использовании метода внутреннего стандарта в качестве внутреннего стандарта выбирают стабильный компонент со временем удерживания, близким по значению ко времени удерживания анализируемого компонента, и чей пик хорошо разделен со всеми другими 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 объема индивидуальных растворов сравнения, рассчитывают отношения площадей или высот пиков стандартного образца к таковым для внутреннего стандарта. Строят калибровочную кривую, откладывая значения этих отношений по оси ординат в зависимости от количества стандартного образца (или отношения количеств стандартного образца и внутреннего стандарта), откладываемого по оси абсцисс. Калибровочную функцию обычно получают с помощью линейной регрессии. Затем в соответствии с методикой, указанной в частной фармакопейной статье, готовят раствор испытуемого образца, содержащий такое же количество внутреннего стандарта, что и растворы сравнения, используемые для построения калибровочной кривой. 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 считают содержание компонента или рассчитывают его, используя калибровочную функцию.

С использованием одноточечной калибровки. В соответствии с частной фармакопейной статьей 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

В частных фармакопейных статьях может быть указано, при условии доказательства линейности пиков, что содержание компонента испытуемого образца в процентах рассчитывают путем 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.

ИНЫЕ ФАКТОРЫ

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

Мешающие пики

Пики, соответствующие растворителям и реактивам, или пики, обусловленные компонентами подвижной фазы или матрицы испытуемого образца, не учитывают.

Измерение площади пика

Интегрирование площади любого пика, который не полностью разделяется с основным пиком, как правило проводят, отделяя его по касательной (рисунок 2.1.2.36.-9).

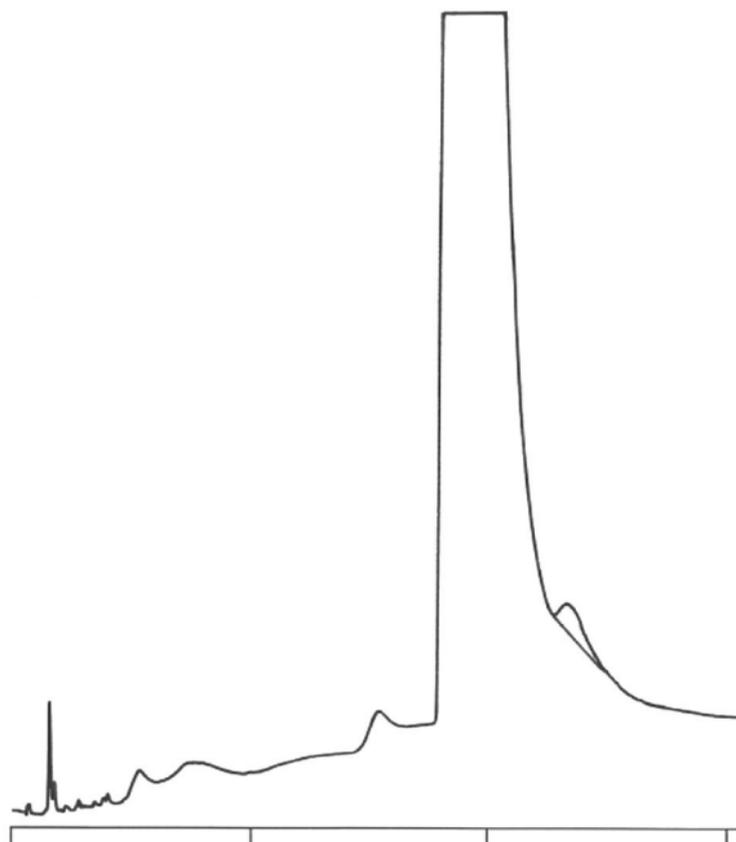


Рисунок 2.1.2.36.-9.

Порог информирования

Если в испытании на родственные примеси определяют сумму примесей или проводят количественное определение примеси, важно выбрать соответствующий порог информирования и подходящие условия для интегрирования площадей пиков.

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