

2.2.46. МЕТОДИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ <sup>(1)</sup>

## ▼ ВСТУП ▲

Методи хроматографічного розділення — це методи багатостадійного розділення, в яких компоненти проби розподіляються між 2 фазами, одна з яких нерухома, а інша — рухома. Нерухома фаза може бути твердою речовиною або рідиною, яка нанесена на твердий носій або гель. Нерухома фаза може бути поміщена в колонку, нанесена у вигляді шару, плівки тощо. Рухома фаза може бути газом або рідиною ■. Розділення може ґрунтуватися на процесах адсорбції, масового розподілу (розділення), іонного обміну тощо, а також на відмінності у фізико-хімічних властивостях молекул, таких як розмір, маса, об'єм тощо.

Дана стаття включає визначення і розрахунки загальних параметрів, а також загальні вимоги, що застосовуються до перевірки придатності хроматографічної системи. Принципи розділення, обладнання і методів подані у відповідних загальних статтях ■:

- хроматографія на папері (2.2.26);
- тонкошарова хроматографія (2.2.27);
- газова хроматографія (2.2.28);
- рідинна хроматографія (2.2.29)
- ексклюзивна хроматографія (2.2.30).

■

## ВИЗНАЧЕННЯ

Вимоги для оцінки придатності системи, наведені в монографіях, встановлені з використанням параметрів, зазначених нижче. При використанні певного обладнання деякі параметри, такі як відношення «сигнал/шум» і ступінь розділення, можуть розраховуватися за допомогою програмного забезпечення, що постачається виробником обладнання. Користувач має забезпечити, щоб такі програмні методи розрахунку були еквівалентні зазначеним у Фармакопейній методі, а якщо це не так, то внести необхідні корективи.

## Хроматограма

Хроматограма є графічним або іншим поданням залежності відгуку детектора, або вихідної концентрації, або іншої кількісної характеристики, що використовується як міра вихідної концентрації, від часу або об'єму. Ідеальна хроматограма є послідовністю піків, які мають гаусову форму, на базовій лінії (Рис. 2.2.46.-1),

де  $V_M$  — «мертвий об'єм»;  
 $t_M$  — «мертвий час»;  
 $V_{R1}$  — об'єм утримування піка 1;  
 $t_{R1}$  — час утримування піка 1;

$V_{R2}$  — об'єм утримування піка 2;  
 $t_{R2}$  — час утримування піка 2;  
 $W_h$  — ширина піка на напіввисоті;  
 $W_i$  — ширина піка між точками перегину;  
 $h$  — висота піка;  
 $h/2$  — напіввисота піка.

Константа розподілу ( $K_D$ )

В ексклюзивній хроматографії характеристика елювання компонента на конкретній колонці може бути подана константою розподілу (відома також як коефіцієнт розподілу), що розраховують за рівнянням:

$$K_D = \frac{t_R - t_0}{t_i - t_0}$$

де  $t_R$  — час утримування;  
 $t_0$  — час утримування неутриманого компонента;  
 $t_i$  — повний час ексклюзії.

Об'єм затримки ( $D$ )

Об'ємом затримки (відомий також як об'єм затримки градієнта  $V_D$ ) є об'єм між точкою, в якій різні рухомі фази починають змішуватися, і входом у колонку. Він може бути визначений з використанням такої методики.

Колонка: замінюють хроматографічну колонку підходящою капілярною трубкою (наприклад, 1 м × 0.12 мм).

Рухома фаза:

- рухома фаза А: вода ▼ для хроматографії ▲ Р;
- рухома фаза В: 0.1 % розчин (об/об) ацетону Р у ▼ воді для хроматографії Р ▲.

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0–20	100 → 0	0 → 100
20–30	0	100

Швидкість потоку: встановити до набуття достатнього значення протитиску (наприклад, 2 мл/хв).

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 265 нм.

Визначають час ( $t_{0.5}$ ), у хвилинах, за якого оптична густина зростає на 50 % (Рис. 2.2.46.-2).

$$D = t_D \times F,$$

де  $t_D$  — ( $t_{0.5} - 0.5t_G$ ), у хвилинах;  
 $t_G$  — зазначений час градієнта (дорівнює 20 хв);  
 $F$  — швидкість потоку, у мілілітрах за хвилину.

▼ Примітка: де застосовно, це вимірювання виконують з використанням автосамплера у положенні «ін'єкції» для включення об'єму петлі інжектора у об'єм затримки ▲.

1) Ця загальна стаття піддається фармакопейній гармонізації, див. статтю Ph. Eur. 5.8. *Pharmacopoeial harmonisation*.