

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И
СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Е.А. Краснов, А.А. Блинникова

СОВРЕМЕННЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (ГЖХ, ВЭЖХ) В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по специальности 040500 -фармация.

Сибирский государственный медицинский университет
Томск 2007

УДК 543.544.1:615.074

ББК Г 471+ Р 282
К 782
ISBN5-98591-019-9

Краснов Е.А., Блинникова А.А., Современные хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ) в фармацевтическом анализе: Учебное пособие. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2007. – 152с.

В учебном пособии рассмотрены теоретические основы, аппаратурное оформление и аналитические возможности широко используемых хроматографических методов – газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Описаны примеры применения ГЖХ и ВЭЖХ для установления подлинности, испытания на чистоту и количественного определения лекарственных средств. Приведены вопросы для самоподготовки и тест-контроля.

Пособие рассчитано на студентов очного отделения фармацевтических факультетов высших учебных заведений.

Табл.4. Ил.49. Библиогр. 60 назв.

Рецензенты:

Заведующий кафедрой фармацевтической химии фармацевтического факультета ММА им. Сеченова, академик РАМН,
профессор

А.П.Арзамасцев

Заведующая кафедрой фармацевтической химии очного факультета ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России », д.ф.н.,
профессор

Л.М.Коркодинова

Утверждено и рекомендовано к изданию методическим советом фармацевтического факультета (протокол № 1 от 2 ноября 2004 г.) и центральным методическим советом СибГМУ (протокол № 56 от 28 февраля 2005 г.)

ISBN5-98591-019-9

© Е.А.Краснов, А.А.Блинникова, 2007

© Сибирский государственный
медицинский университет, 2007

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
ГЛАВА 1. Газовая хроматография	7
1.1. Газожидкостная хроматография	7
1.1.1. Система подготовки газов	9
1.1.2. Дозирующие устройства	10
1.1.3. Испаритель	10
1.1.4. Хроматографические колонки	10
1.1.5. Детекторы	15
1.1.6. Температурный режим	20
1.2. Хроматографические параметры	20
1.3. Теоретические представления в газовой хроматографии	25
1.3.1. Теория эквивалентных теоретических тарелок	25
1.3.2. Оценка эффективности, селективности и разделительной способности хроматографических колонок	26
1.4. Качественный анализ	31
1.5. Количественный анализ	35
1.5.1. Метод абсолютной градуировки	35
1.5.2. Метод внутренней нормализации	37
1.5.3. Метод внутреннего стандарта	41
1.6. Хромато-масс-спектрометрия	44
1.7. Некоторые сведения о хроматографических приборах	48
Вопросы для самоподготовки	52
Тест-контроль	53
Ответы к тест-контролю (ГЖХ)	56
ГЛАВА 2. Жидкостная хроматография	57
2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления)	57
2.1.1. Характеристика микромасштабной ВЭЖХ	60
2.1.2. Классификация методов микро-ВЭЖХ	61
2.1.3. Принцип анализа методом ВЭЖХ, основные узлы хроматографа и их характеристика	64
2.1.4. Качественный и количественный анализы	71
2.1.5. Современные жидкостные хроматографы	76
2.1.6. Альтернативный вариант традиционной ВЭЖХ	79
Вопросы для самоподготовки	82

Тест-контроль	83
Ответы к тест-контролю (ВЭЖХ)	86
Литература	87
Приложение 1	91
Общая фармакопейная статья ОФС 42-0004-01 Остаточные органические растворители	91
Фармакопейная статья ФС 42-3072-00 Спирт этиловый 95%	98
Хроматографический анализ спирта этилового (протоколы)	104
НД 42-9360-00 Раствор диклофенака для инъекций 25 мг/мл в ампулах по 3 мл	106
НД 42-9121-98 Эналаприла малеат	111
НД 42-9123-98 Пенициллин Фау (У)	115
Фармакопейная статья ФС 42-1730-95 Масло облепиховое (подлинность)	119
НД 42-7706-97 Септолете пастилки	120
Приложение 2	125
НД-42-1395-01 Таблетки энап по 10 и 20 мг	125
Протокол анализа таблеток энап по 20 мг № 20	138

Хроматографией называется метод разделения смеси на составляющие ее компоненты, основанный на различной скорости движения веществ, непрерывно распределяющихся между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Он отличается от других двухфазных процессов разделения именно наличием неподвижной (стационарной) фазы с развитой поверхностью, что позволяет получить высокую эффективность на единицу длины слоя неподвижной фазы (НФ).

Подвижная фаза (ПФ) может быть газообразной или жидкой. Если ПФ газообразна, то процесс называется газовой хроматографией, а если жидкость, то такой процесс носит название жидкостной хроматографии. НФ обеспечивает разделение молекул смеси, если эта фаза обладает хотя бы одним из четырех приведенных ниже основных свойств: 1) физически сорбирует растворенные вещества из раствора; 2) осуществляет химическую сорбцию растворенных веществ; 3) растворяет разделяемые вещества в несмешивающемся растворителе при контакте с растворами; 4) имеет пористую структуру и поэтому удерживает одни растворенные вещества и не задерживает другие в зависимости от их размера или формы.

Хроматографические методы активно применяются в научных исследованиях, в различных отраслях промышленности, в медицине, криминалистике, для контроля окружающей среды и т.д. Необычайно разнообразны анализируемые ими объекты: пищевые продукты, белки, лекарственные средства, микроорганизмы, нефть, газ, металлы, лунный грунт и атмосфера планет Солнечной системы.

Наиболее широкое распространение из хроматографических методов аналитического и препаративного разделения многокомпонентных смесей получили газожидкостная (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), благодаря высокой чувствительности, эффективности, селективности, экспрессности, возможности автоматизации в сочетании с другими физико-химическими методами. Отличительной их особенностью является универсальность, т.е. Возможность использования для разделения и определения твердых, жидких и газообразных неорганических и органических соединений в широком интервале концентраций.

Указанные хроматографические методы дают возможность проводить качественный и количественный анализы лекарственных средств, изучать их физико-химические свойства, осуществлять контроль и автоматическое регулирование технологических процессов. При этом объектами исследований служат лекарственные средства животного, растительного, синтетического и минерального происхождения.

В настоящем пособии рассмотрены теоретические основы и аналитические возможности широко используемых хроматографических методов – ГЖХ и ВЭЖХ. Показана их исключительная универсальность, позволяющая решать задачи разделения смесей самых различных веществ – от самых простых до сложнейших органических соединений. На ряде примеров описано применение указанных методов для целей фармакопейного анализа.

Учитывая, что пособие рассчитано в основном на студентов, приведены вопросы для самоподготовки и тест-контроля по хроматографическим методам.

При подготовке настоящего учебно-методического пособия включались только те сведения, знание которых необходимо для качественного и количественного анализов субстанций и лекарственных средств и обнаружения в них примесей. Для иллюстрации использован ряд нормативных документов (ФС, ФСП, НД). Для ознакомления с дополнительными сведениями по хроматографическим методам отсылаем читателей к прилагаемому списку литературы.

Глава 1. Газовая хроматография

Газовая хроматография является одним из широко применяемых аналитических методов. Она реализуется в двух модификациях в зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы:

1 – газовая адсорбционная;

2 – газожидкостная.

В первом случае неподвижной фазой является **твердый сорбент**, во втором – **высококипящая жидкость**, нанесенная в виде тонкой пленки на твердый сорбент. Анализируемое вещество в обоих случаях – газ.

В практике фармацевтического анализа широкое применение находит **газожидкостная хроматография**, которая была предложена в 1952 году английскими учеными А.Джеймсом и А.Мartiном.

Газожидкостная хроматография – мощный и вместе с тем простой, универсальный метод разделения и анализа сложных смесей разнообразных органических веществ.

Используемые в настоящее время детекторы обладают очень высокой чувствительностью (предел обнаружения 10^{-8} - 10^{-9} г или до 1нг), хорошей воспроизводимостью и точностью.

1.1. Газожидкостная хроматография

В основе газожидкостной распределительной хроматографии (ГЖХ) лежит различие в растворимости разделяемых веществ, на выбранном неподвижном растворителе в хроматографической колонке или более точно – **различие коэффициентов их распределения между неподвижной жидкой фазой (НЖФ) и подвижной газовой фазой (ПГФ)**, газом-носителем.

Необходимыми условиями реализации этого метода являются летучесть компонентов смеси и их устойчивость при температуре разделительной колонки.

Анализируемые вещества (или смесь веществ) в газообразном состоянии смешиваются с потоком газа-носителя и проходят через колонку. В колонке находятся частички твердого носителя с тонким слоем высококипящей жидкости. Компоненты анализируемой смеси, растворяясь в этой жидкости распределяются между ПГФ и НЖФ в соответствии с коэффициентом распределения. После установления в первый момент равновесия между ПГФ и НЖФ газ вместе с нерастворившейся в НЖФ частью анализируемой пробы устремляется вглубь колонки, где также устанавливается равновесие. В то же время новая порция чистого газа-носителя вступает в равновесие с НЖФ, содержащей растворенные компоненты, и часть из них переходит в ПГФ.

Указанные процессы (последовательный переход из ПГФ в НЖФ и опять в ПГФ) совершаются до тех пор, пока молекулы анализируемых компонентов не пройдут через всю колонку. При этом менее растворимый в НЖФ компонент проходит через колонку быстрее, чем более растворимый, так как время его пребывания в стационарной фазе будет меньше.

Принцип хроматографического разделения показан на рис.1.

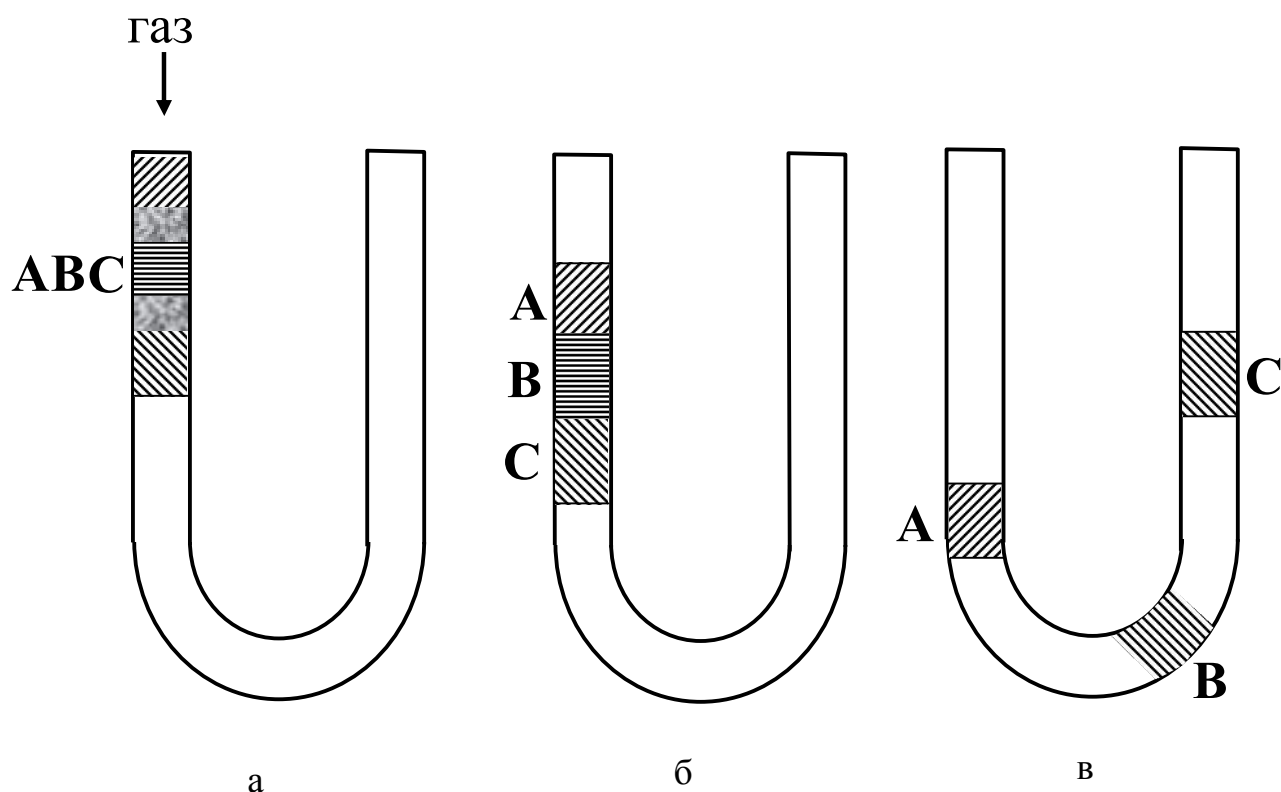


Рис.1. Схема разделения смеси веществ

Образец трехкомпонентной анализируемой смеси продувается с помощью газа-носителя через слой неподвижной жидкой фазы. Поскольку компоненты смеси обладают различной сорбируемостью, их движение в колонке будет замедляться по-разному. Чем больше сорбируемость молекул, тем сильнее будет их торможение и наоборот. Следовательно, компоненты смеси будут двигаться с разной скоростью. Через некоторое время вперед уйдет компонент С, как менее сорбирующийся, за ним компонент В и, наконец, компонент А, как более сорбирующийся и поэтому медленнее движущийся. В момент (б) компоненты еще не полностью отделились друг от друга. Однако через некоторое время произойдет их полное разделение (в). На выходе из колонки состав выходящих порций газа фиксируется с помощью детектора и регистрируется на хроматограмме в виде пиков.

Ограничения в применении метода возникают из-за заметной летучести подавляющего большинства неподвижных жидких фаз при температуре разделительной колонки.

Блок-схема современного газового хроматографа представлена на рис.2.

Все функциональные системы взаимосвязаны. Рассмотрим подробнее работу каждого из перечисленных узлов хроматографа.

1.1.1. Система подготовки газов

Система подготовки газов включает баллон с сжатым газом (1), блок подготовки газа-носителя (2), включающий регулятор расхода газа (3), измеритель расхода газа (4) и фильтр (5). Она выполняет задачу установки, стабилизации и очистки потоков газа-носителя и дополнительных газов (если они необходимы для питания детектора).

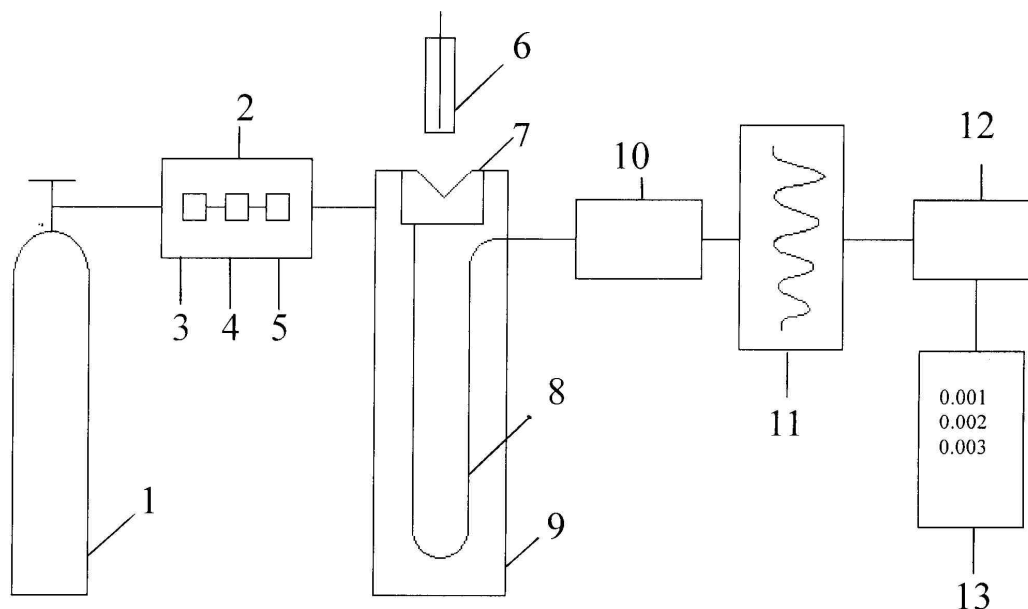


Рис.2. Блок-схема газового хроматографа

1 – баллон с сжатым газом; 2 – блок подготовки газа-носителя; 3 – регулятор расхода газа; 4 – измеритель расхода газа; 5 – фильтр; 6 – микрошприц для введения пробы; 7 – испаритель; 8 – хроматографическая колонка; 9 – термостат; 10 – детектор; 11 – самописец; 12 – интегратор; 13 – цифровое печатающее устройство.

В системе подготовки газов важное значение имеют установка и стабилизация оптимальной для данного анализа величины расхода газа-носителя, поскольку они влияют на характеристики пиков анализируемых веществ. Газ-носитель подается из газового баллона через редуктор, а расход газа определяют с помощью регуляторов давления. Очистка газов от пыли, влаги, органических соединений осуществляется с помощью фильтров, установленных после баллона.

К газу-носителю предъявляется ряд требований: он должен быть инертным, достаточно чистым, иметь как можно меньшую вязкость, обеспечивать высокую чувствительность детектора, взрывобезопасным, доступным. Указанным требованиям удовлетворяют в основном **гелий, азот, аргон**. Водород, используемый в ряде случаев имеет два недостатка, препятствующих его применению: во-первых, он огне- и взрывоопасен и, во-

вторых, химически реакционноспособен по отношению к ненасыщенным или способным к восстановлению веществам.

1.1.2. Дозирующие устройства

В аналитической практике приходится иметь дело с пробами, разнообразными как по величине, так и по агрегатному состоянию. Многие вещества, разлагающиеся при высоких температурах, можно хроматографировать в виде их устойчивых производных.

Универсального дозирующего устройства, позволяющего эффективно вводить большие и малые газообразные, жидкие и твердые пробы, не существует, поэтому используют несколько типов дозаторов.

Жидкие пробы вводят в поток газа-носителя либо непосредственно путем впрыскивания из микрошприца через мембрану, изготовленную из силиконовой самоуплотняющейся резины, либо с помощью специальной петли, которую предварительно заполняют образцом, а затем подключают к системе. В капиллярной газовой хроматографии используют специальные дозаторы. Объем вводимой пробы зависит от типа детектора, количества НЖФ и диаметра колонки. Обычно объем смеси, анализируемой методом ГЖХ, составляет для жидкостей от сотых долей мкл до 10 мкл. Дозирование – одна из ответственных операций, и ошибки при ее выполнении составляют, как правило, большую часть погрешности анализа.

1.1.3. Испаритель

Испаритель представляет собой нагреваемый до определенной температуры металлический блок с каналом для ввода и испарения жидкой пробы. В канал подается поток предварительно нагретого газа-носителя. Игла шприца с анализируемой жидкостью вводится через термостойкое уплотнение в канал испарителя. Введенная проба быстро испаряется и переносится потоком газа в колонку. Обычно температура испарителя на 30-50⁰С выше температуры кипения наиболее высококипящих компонентов смеси, чтобы обеспечить быстрое испарение. В то же время температура должна быть не очень высокой, чтобы исключить термическую деструкцию или изменение состава анализируемых соединений.

1.1.4. Хроматографические колонки

Поток газа-носителя вместе с пробой поступает в колонку, где происходит сорбция.

Хроматографическая колонка должна отвечать ряду требований, в том числе:

- материал, из которого изготовлена колонка, не должен быть катализически активным по отношению к сорбенту и компонентам разделяемой смеси;

- необходимо, чтобы сечение колонки не изменялось при нагревании до рабочей температуры, и чтобы колонке можно было придавать нужную форму.

Обычно колонки изготавливают из боросиликатного стекла, кварца, нержавеющей стали, полимеров (чаще тефлона). Различают 2 вида аналитических колонок: насадочные (набивные), капиллярные.

Насадочная колонка – разделительная колонка, внутренняя полость которой полностью заполняется инертным твердым носителем, покрытым тонкой пленкой нелетучего вещества (НЖФ). Обычно длина насадочных колонок колеблется от 1 до 5 м, а внутренний диаметр – от 2 до 4 мм.

Микронасадочные колонки отличаются от насадочных только меньшим диаметром трубок, равным 0,6-2,0 мм.

Конфигурация колонок может варьировать. Обычно используют прямые, изогнутые или спиральные колонки. В настоящее время применяются преимущественно спиральные колонки различных типов, что позволяет уменьшить габариты термостата.

Капиллярные колонки получили свое название от материала, из которого их изготавливают: капиллярных трубок с внутренним диаметром 0,1-0,5 мм и длиной от 10 до 100 м, выполненных чаще из плавленого кварца или стекла.

Насадочные колонки заполняются твердым пористым носителем, пропитанным неподвижной высококипящей жидкой фазой, на которой происходит процесс разделения. Количество жидкой фазы составляет 5-30% от массы твердого носителя, которым обычно служит практически инертное твердое вещество. Основное назначение твердого носителя в хроматографической колонке – удерживать жидкую фазу на своей поверхности в виде однородной пленки.

К носителю предъявляются следующие требования:

- он должен быть механически прочным и иметь развитую поверхность, чтобы удерживать необходимое количество НЖФ ($\approx 20 \text{ м}^2/\text{г}$);
- он должен быть инертным, то есть не проявлять адсорбционной и каталитической активности как по отношению к анализируемым веществам, так и к жидкой фазе.

В качестве **твердых носителей** применяют материалы на основе кремнезема – диатомита и кизельгура (сфорохромы, хроматоны, хезосорбы, цеолиты); фторуглеродных полимеров (тефлон, полихром), полистирола и сополимеров стирола и дивинилбензола (полисорбы) и др. Диатомитовые носители получают после специальной обработки панцирей одноклеточных ископаемых микроорганизмов (диатомий). Это микроаморфный, содержащий воду, диоксид кремния. К таким носителям относят хромосорб W, хромотон N и др. Они выдерживают высокие рабочие температуры, но без специальной обработки обладают выраженной адсорбционной активностью. Для ее снижения их обрабатывают различными кремнийорганическими соединениями (силанизирование). Тефлоновые носители – синтетические. Они более инертны, чем диатомитовые, но, к сожалению,

не выдерживают высокой температуры. При 200°C отдельные частицы спекаются и проходимость колонки нарушается. Недостатком тефлоновых носителей является также трудность заполнения ими колонок (частицы электризуются и слипаются, нарушается сыпучесть насадки). В зависимости от задач анализа свойства носителей можно изменять обработкой их кислотами или щелочами, а также силанизированием, например, обработка носителя гексаметилдисилазоном (ГМДС), под действием которого группы $\text{Si} - \text{OH}$ переходят в $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Наиболее часто используется размер частиц твердого носителя от 0,1 до 0,5 мм.

Неподвижные жидкие фазы. Для обеспечения селективности колонки важно правильно выбрать НЖФ. В качестве НЖФ применяют высококипящие жидкости, которые должны отвечать следующим требованиям: 1) быть инертными по отношению к компонентам смеси и носителю; 2) термически стойкими; 3) обладать малой вязкостью (иначе замедляется процесс диффузии); 4) незначительной летучестью т.е. обладать очень низким давлением пара при рабочей температуре менее 13,33 Па (0,1 мм рт.ст.), в противном случае количество НЖФ на носителе будет постепенно уменьшаться); 5) иметь достаточную растворяющую способность по отношению к определяемым компонентам разделяемой смеси (если растворимость мала, компоненты из колонки выходят очень быстро). К числу таких жидкостей относятся углеводороды и их смеси (вазелиновое масло, апиезоны), ДМФА, сложные эфиры и полиэфиры, силоксановые полимеры без функциональных групп и с некоторыми привитыми группами, полигликоли и др.

Различают жидкие фазы трех типов: **неполярные** (насыщенные углеводороды и др.), **умеренно полярные** (сложные эфиры, нитрилы и др.) и **полярные** (полигликоли, гидроксилламины и др.) В ГЖХ применяются силиконы различной полярности – от неполярных до сильнополярных. Полярность их определяется характером и числом заместителей.

Каждая НЖФ характеризуется значением максимально допустимой рабочей температуры. Большая часть используемых в ГЖХ НЖФ не выдерживает высоких температур (свыше 200°C). Из фаз с высокой максимально допустимой рабочей температурой чаще других используются полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли и их эфиры и, в особенности, силиконовые полимеры.

Зная свойства НЖФ и природу разделяемых веществ, например, класс, строение, можно достаточно быстро подобрать подходящую для разделения данной смеси селективную жидкую фазу. При этом следует учитывать, что время удерживания компонентов будет приемлемым для анализа, если полярности стационарной фазы и вещества анализируемой пробы близки.

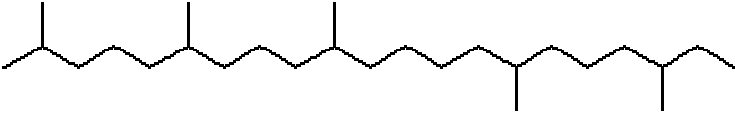
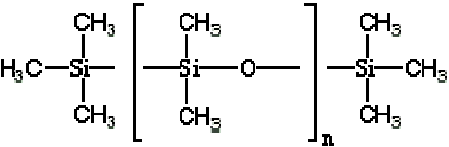
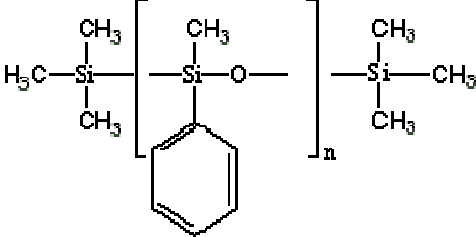
Для растворенных веществ с близкой полярностью порядок элюирования обычно коррелируют с температурой кипения и, если разница температур достаточно велика, возможно полное разделение. С увеличением

полярности жидкой фазы время удерживания полярных соединений возрастает.

В табл.1 приведены некоторые жидкие фазы и максимальные температуры, при которых их можно использовать. Многие силиконы имеют максимальную допустимую рабочую температуру 350-400⁰С.

Т а б л и ц а 1

Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии

Название	Строение	$t_{max}, ^\circ\text{C}$
Сквалан		125
Апиезон	Смешанные углеводороды	300
Силикон		325
Силикон СУ-17		325
Карбовакс 20М	$\text{HO}-(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-})_n\text{-H}$	210
Де	$\text{OH-CH}_2-(\text{-CH}_2\text{-O-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O-CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH}$	200

Эффективность разделения зависит от однородности заполнения колонки, плотности ее набивки, геометрической структуры поверхности частиц носителя, их размера и т.д.

Капиллярные колонки разделяют по способу фиксации НЖФ на два типа: колонки с тонкой пленкой НЖФ (0,01–1 мкм) непосредственно на внутренней поверхности капилляров и тонкослойные колонки, на внутреннюю поверхность которых нанесен пористый слой (5–10 мкм) твердого вещества, выполняющего функцию носителя НЖФ.

Для равномерного нанесения жидкой фазы на твердый носитель ее смешивают с легко летучим растворителем, например, эфиром. К этому раствору добавляют твердый носитель. Смесь нагревают, растворитель испаряется, жидкая фаза остается на носителе. Сухим носителем с нанесен-

ной таким образом НЖФ заполняют насадочную колонку, стараясь избежать образования пустот. Для равномерной упаковки через колонку пропускают струю газа и одновременно постукивают по колонке для уплотнения набивки. Затем до присоединения к детектору колонку нагревают до температуры на 50°C выше той, при которой ее предполагается использовать. При этом могут быть потери жидкой фазы, но колонка входит в стабильный рабочий режим. Правильно подготовленную колонку можно использовать для нескольких сотен определений.

В качестве НЖФ используют различные химические соединения: высококипящие углеводороды, простые и сложные эфиры, полигликоли, силоксаны и др.

В капиллярной колонке существенно уменьшается сопротивление потоку газа, поэтому появляется возможность увеличить длину колонки и повысить таким образом эффективность разделения.

Проба для анализов в капиллярной хроматографии уменьшается в 1000 раз и более, при этом существенно сокращается время анализа. Нередко приходится более 99,9% вводимой пробы выпускать в атмосферу через специальное ответвление и лишь 0,01-0,05% взятого количества направлять в колонку. Детектирование столь малых количеств требует применения высокоэффективных детекторов, например, пламенно-ионизационного.

Большая длина, малый диаметр капилляров обеспечивают высокую эффективность разделения смесей веществ, большую скорость хроматографического разделения, высокую чувствительность, селективность капиллярной хроматографии, являющейся разновидностью газожидкостной.

Выбор **температуры** разделения веществ имеет чрезвычайно важное значение для успеха анализа в целом. Температура колонок определяется главным образом летучестью пробы и может изменяться до $+350^{\circ}\text{C}$. Температуру колонки контролируют с точностью до нескольких десятых градуса и поддерживают с помощью термостата.

Температурный режим хроматографического процесса может быть различным.

При **изотермической** хроматографии для каждой разделяемой смеси существует определенная оптимальная температура. Если компоненты сильно удерживаются на данной колонке, выходят из нее очень медленно или иногда не выходят совсем, то смесь веществ трудно разделить при постоянной температуре. Поэтому используют **программирование температуры**, чаще линейное, которое представляет собой повышение температуры колонки во время анализа с целью ускорения и обеспечения большей гибкости анализа. При этом сначала через колонку проходят более летучие, затем по мере повышения температуры – менее летучие соединения, что приводит к более полному и четкому разделению веществ. Управление температурным режимом колонки осуществляется соответствующим блоком или соответствующей программой в компьютере.

На рис.3 представлены графики зависимости температуры термостата колонок в зависимости от времени при линейном и ступенчатом программировании.

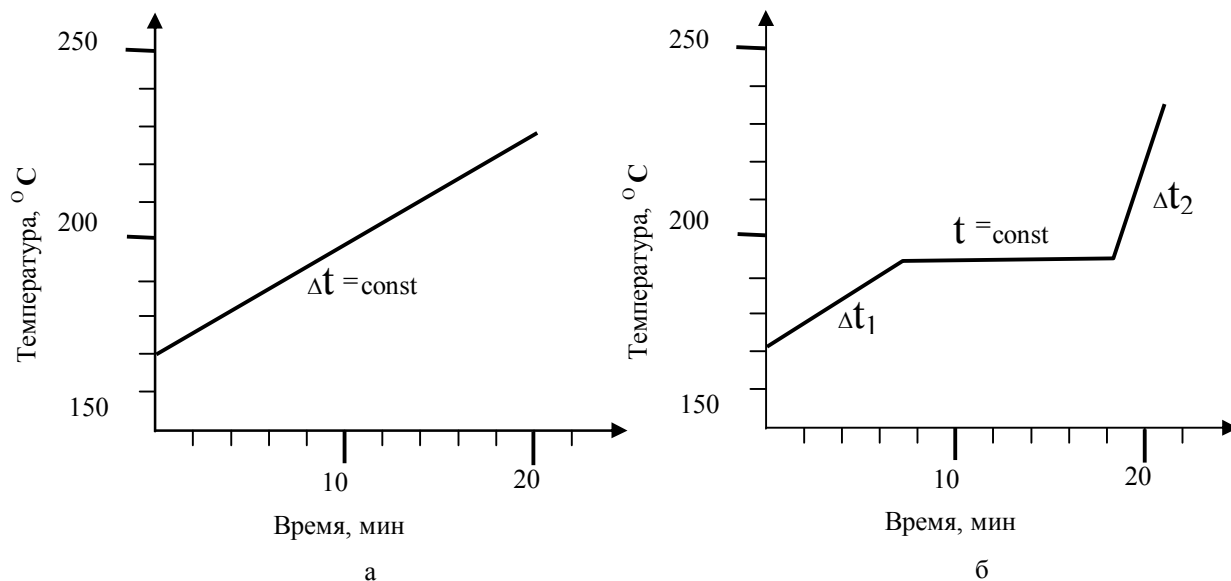


Рис.3. Программирование температуры

а) линейное; б) ступенчатое: два этапа линейного программирования с разной скоростью изменения температуры ($\Delta t_1 \neq \Delta t_2$) сочетаются с изотермой.

1.1.5. Детекторы

Выходящий из колонки газ-носитель вместе с разделенными компонентами поступает в измерительную ячейку детектора.

Можно без преувеличения сказать, что возможности хроматографа в основном определяются характеристиками используемого в нем детектора, который является наиболее ответственным узлом.

Детектор предназначен для обнаружения изменений в составе газа, прошедшего через колонку. Работа его основана на измерении таких физических и физико-химических свойств подвижной фазы и определяемых веществ, которые зависят от количества и природы веществ. Эти свойства детектор преобразует в электрический сигнал, который затем регистрируется самопишущим устройством. Обычно детектор устанавливается на выходе хроматографической колонки, при этом возможны схемы, когда к одной колонке подсоединяются несколько детекторов и, наоборот, с несколькими колонками соединяется один детектор.

Необходимо поддерживать температуру детектора и соединений между ним и колонкой достаточно высокой, чтобы исключить конденсацию анализируемых веществ жидкой фазы.

Для газовой хроматографии предложено около 20 типов детекторов, однако полный комплект современного универсального хроматографа включает не более 4-6 детекторов.

Наибольшее распространение в силу универсальности, превосходных характеристик и высоких эксплуатационных качеств получили детектор по **теплопроводности (катарометр)** и **пламенно-ионизационный детектор**. Они входят в состав почти всех хроматографов.

Для анализа сложных смесей удобны **селективные детекторы**. Они имеют повышенную чувствительность к веществам определенного класса. К ним относится **электрозахватный** детектор ионизационного типа, чувствительный к соединениям, содержащим галогены, серу, свинец и др. В значительной мере благодаря появлению этого детектора удалось обнаружить повсеместное распределение пестицидов в окружающей среде. **Пламенно-фотометрический** детектор чувствителен к ароматическим углеводородам, соединениям, содержащим серу, хелаты металлов.

Использование селективных детекторов упрощает отделение интересующих веществ от сопутствующих, повышает чувствительность, значительно сокращает время анализа и объем пробы исследуемой смеси.

В хроматографах чаще используются **дифференциальные детекторы**. Они измеряют мгновенную концентрацию или массовую скорость вещества в потоке газа-носителя во времени.

Электрический сигнал детектора непосредственно или через усилитель поступает на регистрирующий прибор. Для регистрации сигнала в большинстве случаев используют самопишущие потенциометры (милливольтметры). Перо регистратора записывает сигнал на движущейся диаграммной ленте или на экране монитора компьютера в виде **хроматограммы**. Каждое вещество на хроматограмме образует кривую, которую называют **пиком** (рис.4), при этом количество каждого компонента пропорционально его площади S .

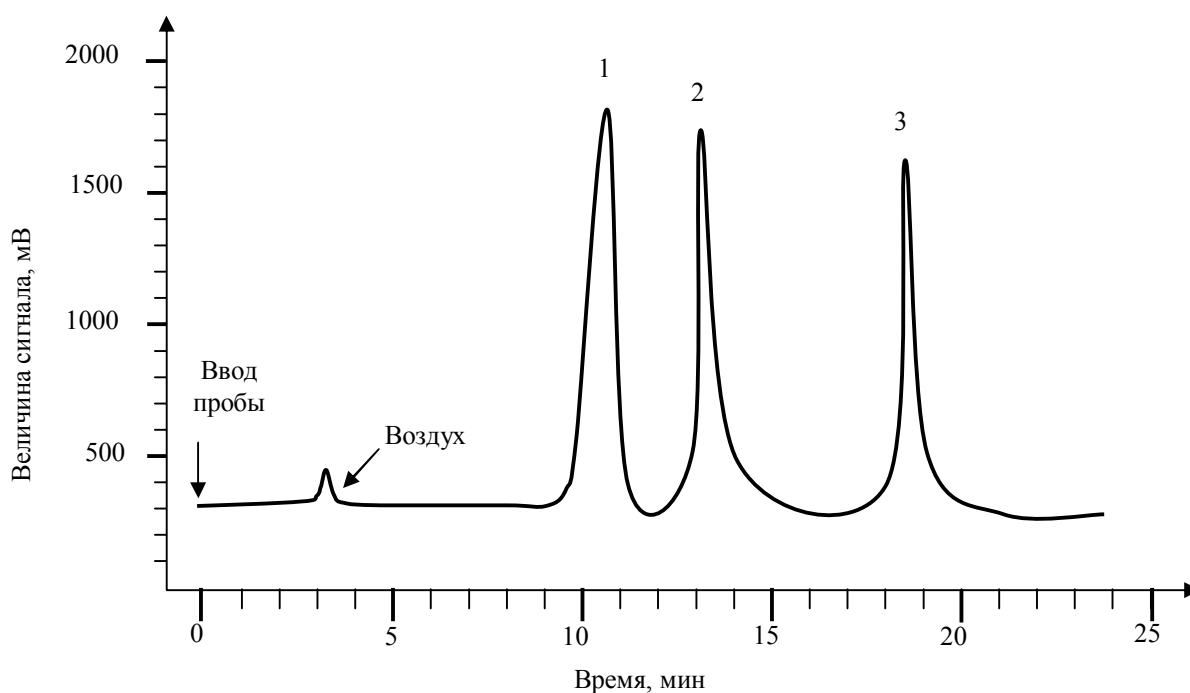


Рис.4. Типичная хроматограмма

При хорошо подобранных условиях разделения количество пиков на хроматограмме соответствует числу компонентов смеси. Обычно на оси абсцисс регистрируют время (с, мин), а на оси ординат – сигнал детектора (мВ или А).

Действие **детектора по теплопроводности** основано на изменении теплопроводности газа-носителя в присутствии других веществ.

Рассмотрим кратко устройство **детектора по теплопроводности (катарометра)**. Катарометр (рис.5) представляет собой массивный металлический блок, в цилиндрические отверстия (камеры) которого помещены чувствительные элементы – металлические спирали из тончайшей проволоки (Pt, W, Ni) или полупроводниковые сопротивления, закрепленные в кронштейне.

Камеры детектора через входной и выходной каналы продуваются газом-носителем.

Чувствительные элементы нагреваются постоянным током до температуры, значительно превышающей температуру блока (например, на 100°C). Если весь блок греется до 150°C , то спирали катарометра до 250°C .

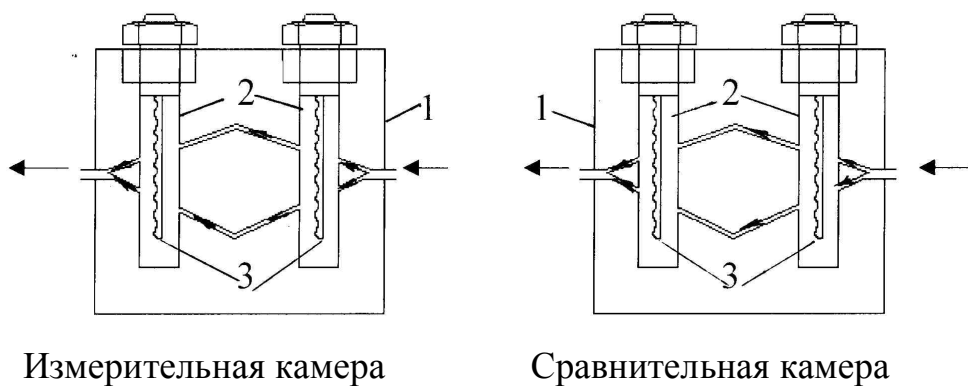


Рис.5. Схемы ячеек детектора по теплопроводности

1 – металлический блок; 2 – цилиндрическое отверстие-камера; 3 – чувствительный элемент.

Для получения дифференциального сигнала через измерительную камеру катарометра проходит газ, выходящий из хроматографической колонки, а через сравнительную камеру – чистый газ-носитель. Измерительная и сравнительная ячейки детектора включены по мостовой схеме таким образом, что разбаланс моста наступает только в период прохождения через измерительную ячейку детектора газа-носителя с разделенными компонентами. При этом нагретые чувствительные элементы в сравнительной и измерительной камерах обдуваются вначале потоком газа-носителя, и их сопротивление приобретает определенное одинаковое значение. При прохождении через детектор бинарной смеси, состоящей из газа-носителя и определяемого компонента с отличающейся от чистого газа-носителя теп-

лопроводностью, в измерительной ячейке нарушается теплообмен. При изменении условий теплообмена изменяется температура чувствительного элемента и, как следствие, его сопротивление, что влечет за собой разбаланс моста. Различие сопротивлений чувствительных элементов является функцией мгновенной концентрации компонентов в газовом потоке.

При соблюдении определенных условий с применением детектора по теплопроводности достигается высокая точность количественного анализа.

На детекторной крышке устанавливаются два или четыре детектора по теплопроводности, работающие по дифференциальной схеме, и их суммарный сигнал равен разности напряжений.

Наибольшей чувствительностью обладает **пламенно-ионизационный детектор (ПИД)**, схема которого показана на рис. 6. Предел обнаружения при использовании ПИД составляет до 10^{-10} г, т.е. чувствительность его в 1000 раз выше, чем чувствительность детектора по теплопроводности. Анализируемыми веществами являются органические соединения, галогенопроизводные, карбонильные, ди- и трисульфиды, нитрилы. Поскольку сигнал этого детектора не зависит от скорости потока, он пригоден для количественных аналитических измерений.

Действие пламенно-ионизационного детектора основано на изменении электропроводности пламени водородной горелки при прохождении через нее газовой смеси, выходящей из колонки. Образующиеся при сгорании анализируемой пробы ионы собираются на заряженном электроде, и возникающий в результате ток измеряют с помощью электромагнитного усилителя.

ПИД представляет собой камеру, в которой поддерживается водородное пламя, являющееся источником ионизации. В камеру вводятся необходимые для поддержания пламени водород и воздух: водород подается в детектор в смеси с газом-носителем через канал горелки, а воздух через другой канал. Горелка является одним из электродов, она изолирована от корпуса детектора и соединена с источником стабилизированного напряжения. Второй электрод (электрод-коллектор) расположен над горелкой и имеет цилиндрическую форму. На электроды подается напряжение 90-300 В.

Водород и воздух являются вспомогательными газами. Известно, что при обычных условиях газы не проводят ток. Под действием пламени или радиоактивного излучения в газе образуются ионы, радикалы или свободные электроны. Даже при очень небольшой концентрации этих частиц газы становятся проводниками электрического тока.

В пламени чистого водорода число ионов мало, сопротивление межэлектродного газового пространства очень велико, вследствие чего ток детектора очень мал. При внесении с газом-носителем из колонки анализируемых органических веществ число ионов резко увеличивается. Под действием напряжения на электродах движение заряженных частиц упорядочивается, возникает ионный ток, вызывающий во внешней цепи появление тока.

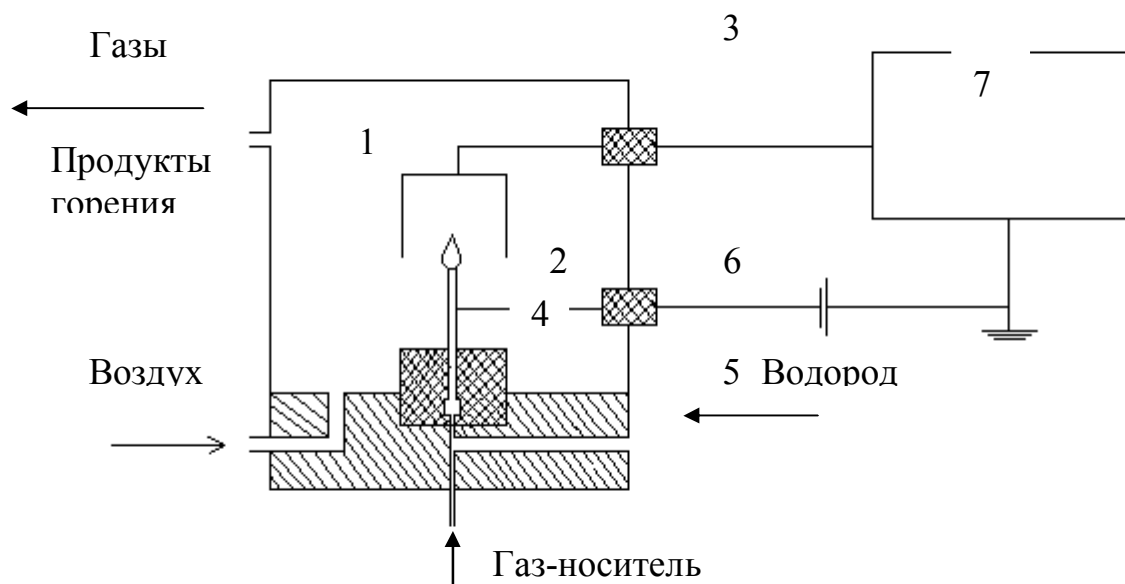


Рис.6. Схема пламенно-ионизационного детектора

1 – электрод-коллектор; 2 – горелка; 3 – изолятор электрода-коллектора; 4 – изолятор горелки; 5 – диффузор; 6 – изолятор питания; 7 – электрометр

На детекторной крышке устанавливаются два ПИД, работающие по дифференциальной схеме так, что суммарный сигнал равен разности ионных токов.

Другую группу образуют **интегральные детекторы**. Они указывают суммарное количество анализируемого вещества, выделяющегося из колонки за время от начала измерения. При этом получается ступенчатая хроматограмма. Детекторы этого типа отмечают общее число разделяемых компонентов. Преимуществом интегральных детекторов перед детекторами других типов является их простота, линейная зависимость показаний от количества вещества. Существенным недостатком интегральных детекторов является низкая чувствительность и значительная инерционность. Поэтому в настоящее время их применяют крайне редко.

1.1.6. Температурный режим

Для соблюдения точности измерений необходимо всегда указывать температуру испарителя, колонки и детектора. В связи с тем, что каждый из этих блоков имеет различное назначение, желательно, чтобы регулирование их проводилось отдельно. В связи с этим у хроматографов имеются соответствующие блоки управления или компьютерные программы.

Температура испарителя должна быть достаточно высокой для того, чтобы обеспечить большую скорость испарения и достаточно низкой, чтобы исключить термическую деструкцию или изменение анализируемых соединений.

Температура колонки должна быть высокой для того, чтобы время анализа было небольшим и в то же время достаточно низкой, чтобы обеспечивалось требуемое разделение.

Температура детектора. Влияние температуры на характер работы детектора в значительной степени зависит от типа детектора. Однако общим правилом является необходимость поддержания температуры детектора и соединений между ним и колонкой достаточно высокой, чтобы исключить конденсацию анализируемых веществ жидкой фазы. Следует однако учесть, что чувствительность многих детекторов (например, катарометров) уменьшается с увеличением температуры, поэтому оптимальная температура лишь незначительно превышает температуру кипения наиболее высококипящего компонента.

Стабильность и связанная с ней максимальная чувствительность детектора по теплопроводности зависят от стабильности регулятора температуры детектора.

1.2. Хроматографические параметры

На рис.7 представлена идеализированная хроматограмма смеси двух веществ. По оси абсцисс отложено *время хроматографирования (объем подвижной фазы)*, по оси ординат – аналитический сигнал, зависящий от концентрации веществ в элюенте (*отклик*).

Нулевая линия – часть хроматограммы, полученная при регистрации сигнала детектора во время выхода из колонки чистой подвижной фазы (до выхода анализируемого вещества);

w – ширина пика – отрезок, отсекаемый на нулевой линии касательными к кривой в точках перегиба;

$w_{0,5}$ – расстояние между контурами пика на середине его высоты.

Символы t_{R1} (V_{R1}); t_{R2} (V_{R2}); t_{R0} (V_{R0}) обозначают время (объем) удерживания определяемых и несорбирующегося компонентов соответственно.

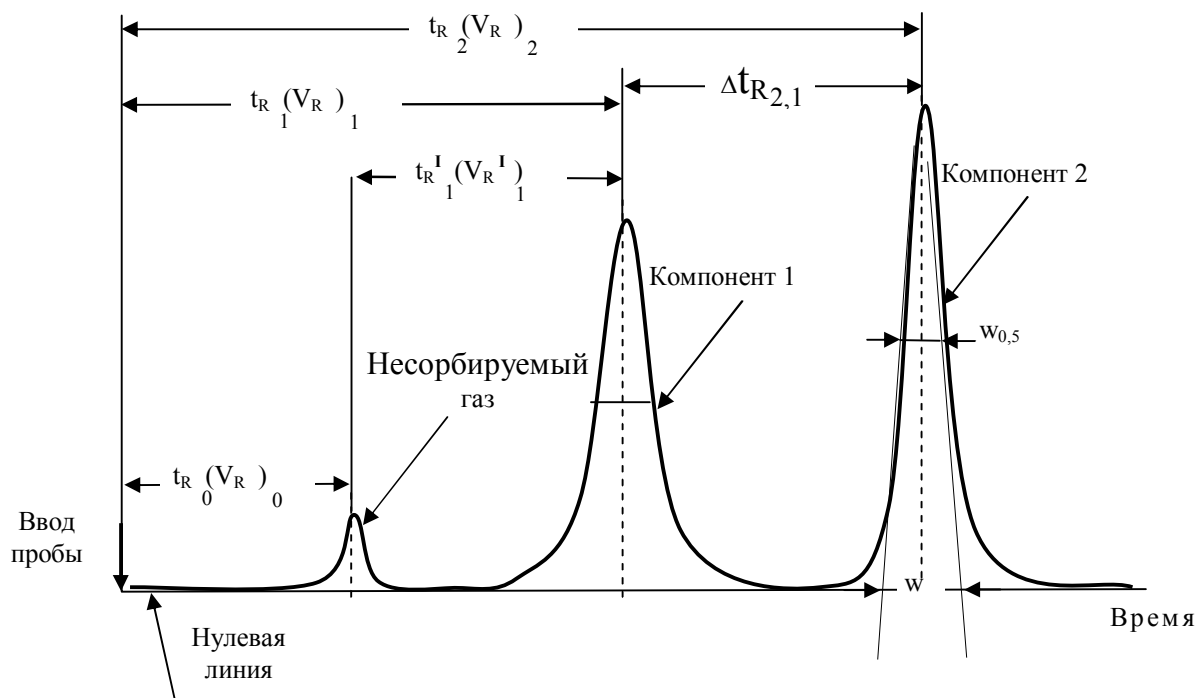


Рис.7. Разрешение пиков и параметры удерживания

Средством выражения результатов хроматографического разделения смеси веществ служат параметры хроматографической кривой – **параметры удерживания**.

Время удерживания (t_R) – время от момента ввода пробы в хроматографическую колонку до момента выхода из нее максимальной концентрации определяемого вещества. Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания вещества в подвижной t_{R0} и неподвижной t_{Rs} фазах:

$$t_R = t_{R0} + t_{Rs} \quad (1.1)$$

Значение t_{R0} фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента. Несорбируемый газ вводят непосредственно перед дозированием анализируемого образца. Коэффициент распределения этого газа очень мал по сравнению с его значением для других компонентов. Обычно при работе с катарометром для этой цели используют азот, воздух или благородный газ. Значение t_R не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, а также упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности следует ввести **приведённое (исправленное) время удерживания t_R^I** :

$$t_R^I = t_R - t_{R0} \quad (1.2)$$

Время удерживания (с или мин) измеряют с помощью секундомера или электронного интегратора.

Для характеристики удерживания часто используют понятие **удерживаемого объема** V_R – объем газа-носителя, прошедший с момента ввода пробы до момента выхода максимальной концентрации определяемого вещества (объем подвижной фазы который нужно пропустить через колонку с определённой скоростью, чтобы элюировать вещество). Объем удерживания находят по уравнению $V_R = t_R \cdot F_{об}$, где $F_{об}$ – объемная скорость газа-носителя ($\text{см}^3/\text{мин}$), измеренная при давлении на выходе из колонки и при температуре колонки, используя блоки (системы) измерения расходов газа-несорбируемого носителя и вспомогательных газов.

Приведенный объем удерживания (V_R^I) – объем удерживания, пересчитанный с учетом поправки на объем удерживания несорбируемого газа (V_{R0}):

$$V_R^I = V_R - V_{R0} \quad (1.3).$$

Объем удерживания несорбируемого газа включает свободные объемы колонки, дозатора (испарителя), детектора и соединительных линий.

Полезным параметром в хроматографии может быть **коэффициент удерживания (замедления)** R – отношение скорости движения вещества к скорости движения подвижной фазы:

$$R = \frac{L/t_R}{L/t_{R0}} = \frac{t_{R0}}{t_R} \quad (1.4.),$$

где L – длина хроматографической колонки. Величина R показывает, какую долю времени вещество находится в подвижной фазе.

Учитывая (1.1), получаем

$$R = \frac{t_{R0}}{t_{R0} + t_{Rs}} = \frac{1}{1 + t_{Rs}/t_{R0}} \quad (1.5).$$

Для неудерживаемого вещества $t_R = t_{R0}$ и $R = 1$.

Если время пребывания в подвижной и неподвижной фазах одинаково ($t_{R0} = t_{Rs}$), то $R = 0,5$.

Очевидно, что R можно выразить через V_R :

$$R = \frac{V_{R0}}{V_R} \quad (1.6).$$

Любой процесс распределения между двумя фазами характеризуют **коэффициентом распределения** D . В данном случае $D = C_s/C_0$, где C_0 и C_s – концентрации вещества в подвижной и неподвижной фазах соответственно.

Если D_1 и D_2 — коэффициенты распределения для первого и второго компонентов, то степень разделения будет тем больше, чем больше отношение D_1/D_2 будет отличаться от единицы. Очевидно, что при $D_1/D_2 = 1$ разделения не происходит.

Коэффициент распределения связан с хроматографическими параметрами. Действительно, отношение времени пребывания вещества в подвижной и неподвижной фазах равно отношению количеств вещества в фазах с V :

$$\frac{t_{R_S}}{t_{R_0}} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_0 \cdot V_{R_0}} = D \frac{V_S}{V_{R_0}} \quad (1.7),$$

где V_S — объём неподвижной фазы колонки.

Учитывая соотношение (1.5), получаем

$$R = \frac{1}{1 + D \frac{V_S}{V_{R_0}}} = \frac{V_{R_0}}{V_{R_0} + DV_S} \quad (1.8)$$

С другой стороны, из выражения (1.6) следует

$$V_R = V_{R_0} + DV_S \quad (1.9)$$

Произведение $D \frac{V_S}{V_{R_0}}$ называют **коэффициентом ёмкости** (κ^I), из экспериментальных данных его вычисляют по формуле

$$\kappa^I = \frac{V_R - V_{R_0}}{V_{R_0}} = \frac{V_R^I}{V_{R_0}} \quad \text{или} \quad \kappa^I = \frac{t_R^I}{t_{R_0}} \quad (1.10)$$

Эта величина показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной; оптимальные значения κ^I лежат в пределах 1,5-4,0. Если коэффициент распределения мал, то мало значение κ^I , т.е. вещество слабо удерживается и продвигается по колонке практически с той же скоростью, что и подвижная фаза. Если же коэффициент ёмкости слишком велик, то время пребывания вещества в колонке будет большим и на анализ потребуется много времени.

Видно, что исправленный удерживаемый объём связан с D простым соотношением:

$$V_R^I = V_R - V_{R_0} = DV_S \quad (1.11)$$

Выражения (1.9) и (1.11) — основные параметры хроматографии, показывающие, что V_R^I пропорционален величине D и объё-

му неподвижной фазы колонки V_S . Величина V_S зависит от количества неподвижной фазы, нанесенной на единицу объёма или массы сорбента, от длины и диаметра колонки. Сравнительно большие различия в значениях V_R^I для двух веществ А и В свидетельствуют о полном их разделении.

Например, если для веществ А и В $D_A = 15,0$ и $D_B = 75,0$, $V_S = 1,5$ мл, $V_{R0} = 3,0$ мл, то можно рассчитать $V_{R(A)}^I$ и $V_{R(B)}^I$, подставляя соответствующие значения в уравнение (1.9):

$$V_{R(A)}^I = 15 \cdot 1,5 + 3,0 = 25,5 \text{ мл}; \quad V_{R(B)}^I = 75,0 \cdot 1,5 + 3,0 = 115,5 \text{ мл.}$$

Таким образом, вещество **А** элюируется первым, а вещество **В** – вторым, и, вероятно, будет происходить их полное разделение вследствие значительного различия в объёмах удерживания.

1.3. Теоретические представления в газовой хроматографии

Одна из главных задач теории хроматографии – изучение размывания хроматографических полос. Это явление может быть обусловлено различными факторами: процессами, протекающими в колонке, медленностью сорбции и десорбции и др. В совокупности они приводят к расширению хроматографических полос и перекрыванию пиков на хроматограмме. Вследствие этого разделение компонентов может вообще не произойти при значительной разнице в коэффициентах распределения.

Наибольшее распространение в газовой хроматографии получили теория эквивалентных теоретических тарелок А. Мартина и диффузионно-массообменная теория (кинетическая теория) Ван-Деемтера.

1.3.1. Теория эквивалентных теоретических тарелок

По аналогии с теорией дистиляционных колонн хроматографическая колонка мысленно разбивается на ряд последовательных теоретических ступеней – тарелок, через которые периодически проходят порции газа. Каждая тарелка содержит подвижную (газовую) и неподвижную (жидкую или твердую) фазы. Предполагается, что за время нахождения порции газа на тарелке успевает установиться равновесие между подвижной и неподвижной фазами для всех компонентов. Таким образом, хроматографический процесс – многоступенчатый и состоит из большого числа актов сорбции и десорбции (в газо-адсорбционной хроматографии) или растворения и испарения (в газожидкостной хроматографии), а сама колонка рассматривается как система, состоящая из совокупности многих ступеней – тарелок.

Длина участка колонки, на которой достигается состояние равновесия между концентрацией вещества в подвижной и неподвижной фазах, называется условно **высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ)**. Существует простая зависимость:

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.12),$$

где L – длина хроматографической колонки, см; N – число теоретических тарелок; H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, см.

Для вычисления числа теоретических тарелок измеряют ширину хроматографического пика на половине высоты $w_{0,5}$, тогда

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (1.13).$$

Количественной мерой размывания хроматографических полос, т. е. **эффективности колонки**, является **ВЭТТ**. С увеличением N эффективность хроматографической колонки возрастает. Например, капиллярные колонки очень эффективные – число теоретических тарелок достигает 500000 (вместо 5000 для стандартных насадочных колонок).

В теории теоретических тарелок реальный хроматографический процесс заменен идеальным, по которому хроматографическая полоса размывается вследствие равновесных процессов между подвижной и неподвижной фазами. Такое рассмотрение размывания хроматографической полосы не вскрывает сущности процесса и не дает информации о том, как подобрать такие условия, которые позволили бы уменьшить величину H и тем самым повысить эффективность хроматографической колонки.

1.3.2. Оценка эффективности, селективности и разделительной способности хроматографических колонок

Одна из основных задач газовой хроматографии состоит в том, чтобы получить хорошее разделение.

Хроматографическое разделение основано на селективности сорбента и различии в термодинамических свойствах хроматографируемых веществ в системе сорбент-элюент. Для решения вопроса о возможности хроматографического разделения смеси на индивидуальные вещества нужно сопоставить их хроматографические параметры.

Для оценки хроматографического разделения компонентов используются три группы критериев.

Первая группа критериев зависит от природы сорбента и сорбата, от температуры колонки и характеризует качество разделения в зависимости от различия адсорбируемости или растворимости разделяемых веществ. К критериям этой группы относятся **коэффициент селективности** $\alpha_{2,1}$ (степень разделения), **селективность** жидкой фазы K_s .

Коэффициент селективности колонки $\alpha_{2,1}$ играет большую роль в достижении хроматографического разделения и является мерой относительного удерживания или относительной подвижности разделяемых веществ:

$$\alpha_{2,1} = \frac{V_{R_2} - V_{R_0}}{V_{R_1} - V_{R_0}} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{K_2^I}{K_1^I} \dots \dots \dots (1.14),$$

где K_1^I и K_2^I коэффициенты емкости компонентов 1 и 2 соответственно, определяемые экспериментально.

Это термодинамическая характеристика, зависящая при постоянстве температуре только от природы разделяемых соединений и свойств подвижной и неподвижной фаз. Если $\alpha_{2,1} = 1$, то вещества не разделяются.

Поскольку скорость перемещения зоны данного вещества в колонке обратнопропорциональна коэффициенту распределения, вещества с разными D будут перемещаться вдоль колонки с разными скоростями, что и приводит к их хроматографическому разделению. Для разделения нужно так подобрать подвижную и неподвижную фазы, чтобы $D_1 \neq D_2$. Величину K^I можно изменять, варьируя D_1 , V_S , а также V_{R_0} . При малых K^I компонен-

ты, как уже указывалось, слабо удерживаются колонкой и наблюдается плохое разделение. При больших k^I разделение улучшается, но увеличивается время хроматографирования. Оптимальное значение $k^I = 1,5-4,0$.

Критерий селективности жидкой фазы характеризует избирательность сорбента и определяется соотношением:

$$K_c = \frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{V_{R_2} + V_{R_1}} = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{t_{R_2} + t_{R_1}} \dots\dots\dots (1.15),$$

Селективность колонки зависит от очень многих факторов. Искусство экспериментатора в большей мере определяется умением воздействовать на селективность разделения. Для этого имеются три очень важных фактора: выбор химической природы сорбента, выбор состава растворителя и его модификаторов и учет химической структуры и свойств разделяемых компонентов. Иногда заметное влияние на селективность оказывает изменение температуры колонки, меняющее коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

Для неразделяющихся веществ $K_c = 0$, при полном разделении компонентов ($K_c \geq 0,4$). Селективность жидкой фазы зависит от размеров колонки, природы газа-носителя, от количества введенной в колонку пробы. Селективность НЖФ характеризуется взаимным расположением пиков разделенных компонентов на хроматограмме. Чем дальше друг от друга они находятся, тем селективнее НЖФ, и наоборот (рис.8).

Вторая группа критериев обусловлена кинетическими и диффузионными факторами, которые вызывают размывание хроматографических полос. К этим факторам относятся: размеры колонки, природа газа-носителя, скорость потока, количество вводимой в колонку пробы и т.д. Совокупность параметров хроматографического опыта, входящих во вторую группу, от которых так же, как и от селективности, зависит качество разделения, можно назвать общим термином – **эффективность**.

Эффективность колонки характеризуется степенью расширения стартовой зоны вещества по мере прохождения его через колонку. В момент ввода анализируемой пробы в колонку вещество занимает стартовую зону определенного размера (как правило, минимально возможной длины). Под действием подвижной фазы эта зона начинает перемещаться к противоположному концу колонки. Однако скорость передвижения молекул, образовавших стартовую зону, будет различна. Часть молекул, передвигаясь между частицами носителя по более короткому пути, будет опережать большую часть молекул, движущихся со средней скоростью. Другая же часть молекул, продвигаясь по более длинному пути, будет отставать. Чем ближе к концу колонки, тем заметнее будет разница в расстоянии между “убежавшими” вперед и “отставшими” молекулами. Таким образом, наблюдается размытие стартовой зоны. Чем меньше размытие, тем эффективнее работает колонка.

Наиболее существенным фактором, влияющим на эффективность колонки, является скорость газа-носителя.

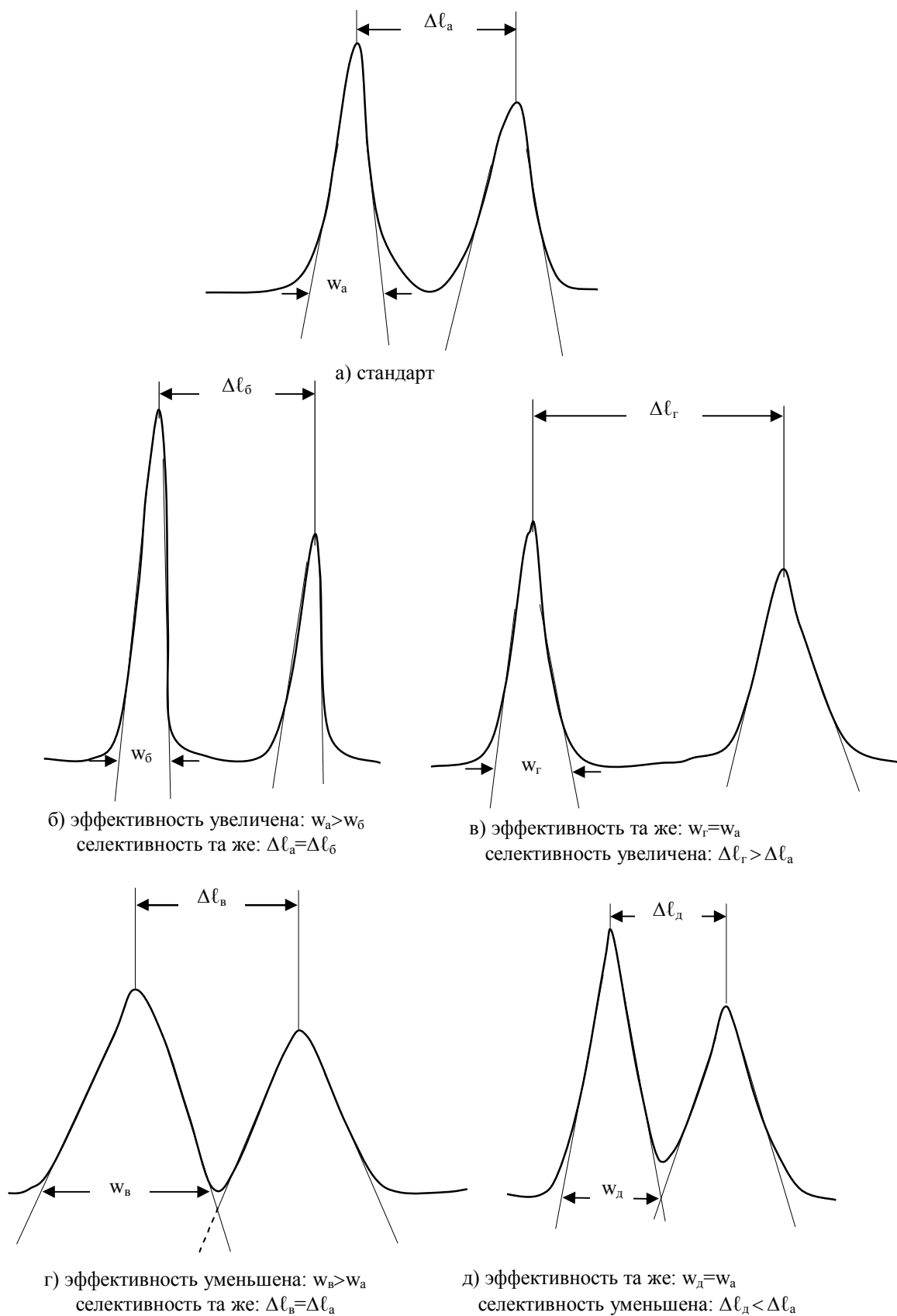


Рис.8. Влияние изменения эффективности колонки и селективности НЖФ на хроматограмму бинарной смеси

С повышением температуры эффективность колонки повышается, так как средняя скорость передвижения молекул увеличивается и разница между “убегающими” и “отстающими” молекулами сглаживается. Размытие стартовой зоны уменьшается. В то же время с повышением температуры снижается селективность НЖФ, так как при высоких температурах сглаживается разница в скоростях движения молекул не только одного вещества, но и разных веществ.

Наоборот, с понижением температуры селективность НЖФ увеличивается, зато снижается эффективность колонки. Оптимальная температура поэтому всегда является своеобразным компромиссом между эффективностью колонки и селективностью НЖФ (рис.9).

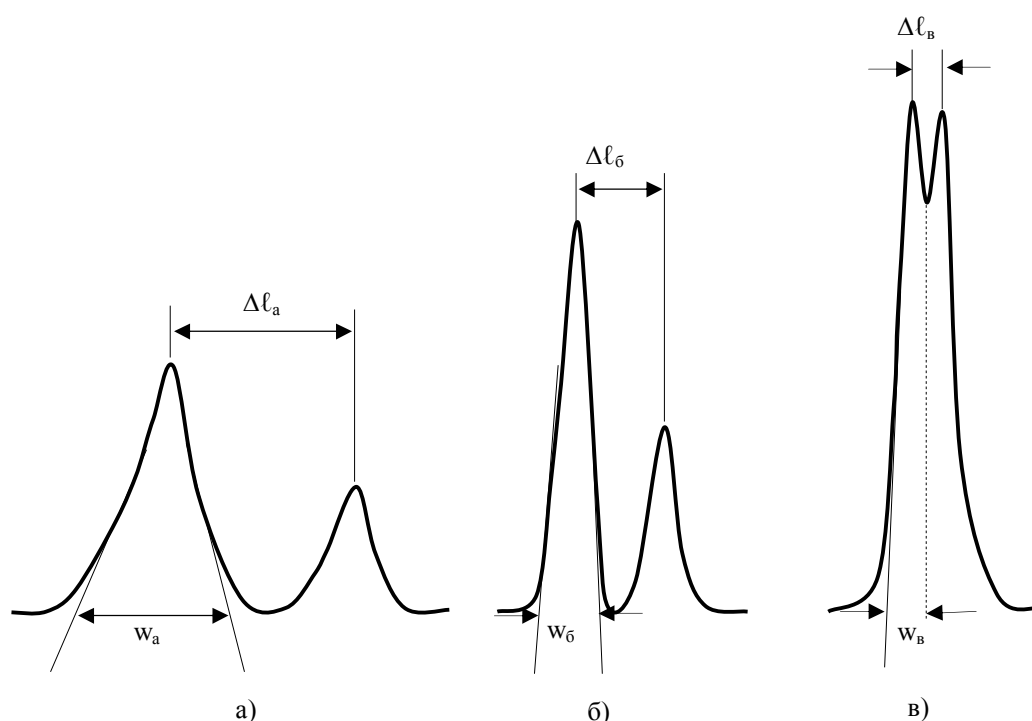


Рис.9. Влияние температуры на разделение ($t_a < t_б < t_в$)

Из данных рис.9 следует, что если $t_a < t_б < t_в$, то $\Delta l_a > \Delta l_б > \Delta l_в$ и $w_a > w_б > w_в$.

Эффективность хроматографической колонки выражается числом теоретических тарелок или высотой, эквивалентной теоретической тарелке. Число теоретических тарелок зависит от длины колонки и свойств сорбента, ВЭТТ зависит только от типа сорбента и характера его упаковки в колонке.

Третья группа критериев учитывает как различие в адсорбируемости анализируемых веществ, так и размывание хроматографических полос.

Предложен **критерий разделения (разрешение) R_s** , характеризующий разделение двух соседних пиков на хроматограмме:

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{(w_2 + w_1)}{2}} = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_2 + w_1} \quad (1.16),$$

где w_1 и w_2 – ширина пиков, измеренная у их основания.
Если для двух близких пиков $w_1 = w_2$, то

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_2} = \frac{\Delta t_R}{w_1} \quad (1.17).$$

Как видно из уравнения (1.16), разрешение пиков зависит от их ширины и от расстояния между максимумами пиков.

Разрешение – функция эффективности N , коэффициента селективности α и ёмкости k^I колонки:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k^I}{1 + k^I} \right) \quad (1.18).$$

Из этого уравнения легко рассчитать число теоретических тарелок, необходимое для разделения с заданным разрешением:

$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{k^I + 1}{k^I} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \quad (1.19)$$

Оптимизация разделения сводится к выбору лучшего сочетания параметров, входящих в уравнение (1.19). Например, для увеличения R_s в два раза нужно увеличить эффективность N или длину колонки L в четыре раза. На величину R_s в большей степени влияет коэффициент селективности: при изменении α от 1,02 до 1,04 R_s увеличивается в два раза.

На рис.8 показано влияние изменения каждого из рассмотренных факторов на общий характер хроматограмм. Как видно из этого рисунка, увеличение эффективности колонки (при сохранении селективности на том же уровне) приводит к сужению пиков и увеличению их высоты ($w_a > w_b$, размытие зоны уменьшается).

Наоборот, уменьшение эффективности колонки приводит к расширению пиков, к их размытию, пики постепенно переходят в “горбы”. Расстояние между максимумами остается постоянным. Если же при постоянной эффективности колонки увеличивать или снижать селективность НЖФ, то пики на хроматограммах будут в первом случае раздвигаться, а во втором сближаться без изменения их геометрической формы.

При использовании малоселективных фаз наблюдается перекрытие пиков – частичное или полное (рис.10 а). В то же время следует помнить, что при использовании селективных фаз может также произойти перекрытие пиков – за счет неэффективной работы колонки (рис.10 б).

Селективность НЖФ определяется химическими и физико-химическими свойствами самой фазы и разделяемыми веществами, то есть характером взаимодействия между ними. Выбор НЖФ для анализа конкретной смеси имеет чрезвычайно важное значение, он осуществляется на основании справочных данных, и часто эмпирически.

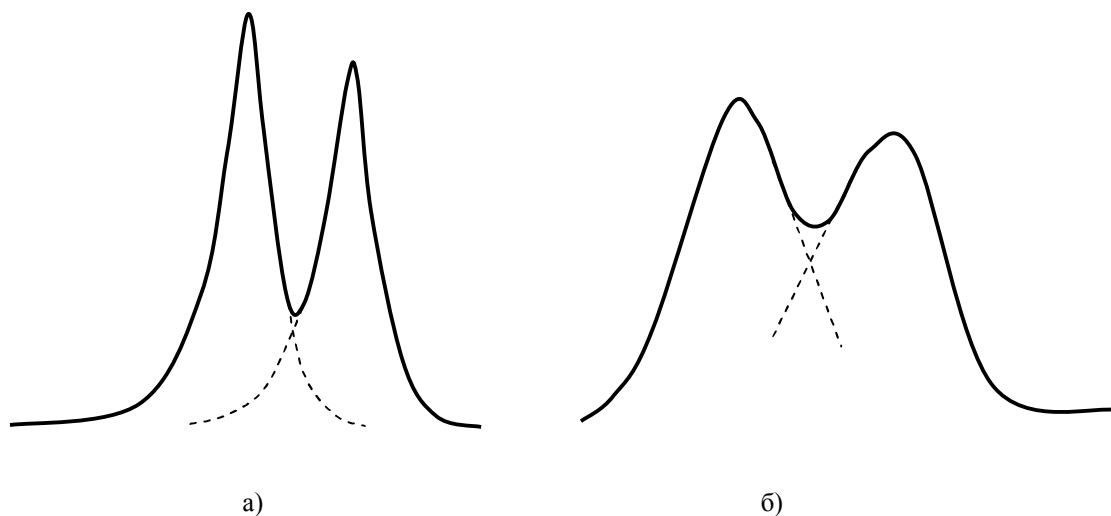


Рис.10. Неполное разделение веществ:

- а) при эффективной колонке, но малоселективной НЖФ;
- б) при селективной НЖФ, но малоэффективной колонке.

1.4. Качественный анализ

В практике качественного хроматографического анализа чаще всего решаются задачи по определению групповой принадлежности веществ, содержащихся в анализируемом образце (углеводороды, спирты, альдегиды и т.д.) и идентификации компонентов смеси.

Качественный анализ проводится методом относительных (приведенных) удерживаний (объем или время) либо с помощью веществ-свидетелей.

На рис.4 изображена типичная хроматограмма анализируемой смеси, состоящей из трех компонентов. На хроматограмме каждому компоненту анализируемой пробы соответствует пик.

При сохранении в ходе опыта постоянными температуры колонки (изотермическая хроматография) и скорости газа-носителя основными качественными характеристиками являются **удерживаемый объем (объем удерживания) (V_R)** и **время удерживания (t_R)** анализируемого вещества (рис.7).

Объемы и времена удерживания могут быть использованы для качественной характеристики соединения лишь при проведении анализа в строго заданных условиях на одном и том же приборе. Для сопоставления получаемых значений удерживаемых объемов с литературными данными или со значениями удерживаемых объемов, полученных на другом прибо-

ре или в иных условиях (для той же неподвижной фазы и температуры колонки), необходимо вводить поправку на объем газа-носителя, не принимающий участия в вымывании компонентов пробы (использовать приведенный объем удерживания, V_R^I).

На величину указанных параметров влияют следующие факторы:

- состав, свойства и количество неподвижной фазы (твердый носитель и нанесенный на него растворитель);
- условия проведения опыта – температура колонки и скорость газа-носителя;
- конструктивные особенности используемой аппаратуры;
- метод дозирования и величина дозы;
- природа газа-носителя, а также перепад давлений газа-носителя на входе и выходе колонки.

Совпадение величин удерживания неизвестного и стандартного соединений свидетельствует о том, что эти соединения могут быть идентичными. Для большей достоверности дополнительно получают данные об их хроматографическом поведении на колонках с различными неподвижными фазами. Если хроматографическое поведение стандартного и неизвестного веществ в таких случаях идентично, то достоверность идентификации возрастает до 99,0%.

Идентификация по параметрам удерживания характеризуется хорошей воспроизводимостью, относительное стандартное отклонение не превышает 2,0%.

Часто идентификацию проводят по **относительному удерживанию** ($t_{R \text{ отн.}}$, $V_{R \text{ отн.}}$), т.е. по отношению приведенного удерживаемого времени (объема) определяемого компонента к приведенному удерживаемому времени (объему) вещества, принятого за стандарт:

$$t_{R \text{ отн.}}^I = t_{R \text{ ст.}}^I / t_{R \text{ ст.}}^I ; \quad V_{R \text{ отн.}} = V_R^I / V_{R \text{ ст.}}^I$$

Эта величина зависит только от состава подвижной и неподвижной фаз.

Зачастую идентификация, основанная на характеристиках удерживания веществ, оказывается несостоявшейся и недостаточной, особенно в исследовательских работах.

В настоящее время основным направлением газовой хроматографии становится исследование сложных смесей природных соединений и биологических материалов. Выделенные стандартные соединения в таких случаях обычно отсутствуют, а ряд компонентов анализируемой смеси почти всегда неизвестен. При этом не исключено перекрывание или неправильная идентификация пиков некоторых компонентов.

Поэтому в настоящее время уделяется значительное внимание разработке селективных детекторов, а хроматографический анализ дополняют спектрометрическим анализом, главным образом, масс-спектрометрией. Тем не менее, идентификация анализируемых компонентов по характери-

стикам удерживания (время удерживания, объем удерживания, относительный объем удерживания и т.д.) используется чаще всего, поскольку этот метод не требует сложного хроматографического оборудования.

Существует несколько вариантов идентификации на основе характеристик удерживания.

Один из вариантов состоит в сравнении анализируемой и эталонной смесей в одинаковых условиях.

Равенство времен удерживания пиков соответствующих компонентов обеих смесей может служить основанием идентификации. На рис.11 представлены хроматограммы испытуемой (а) и эталонной (б) смесей, полученные в одинаковых условиях. Равенство времен удерживания анализируемых и эталонных веществ при сопоставлении хроматограмм позволяет сделать вывод о присутствии в анализируемой смеси метанола и этанола.

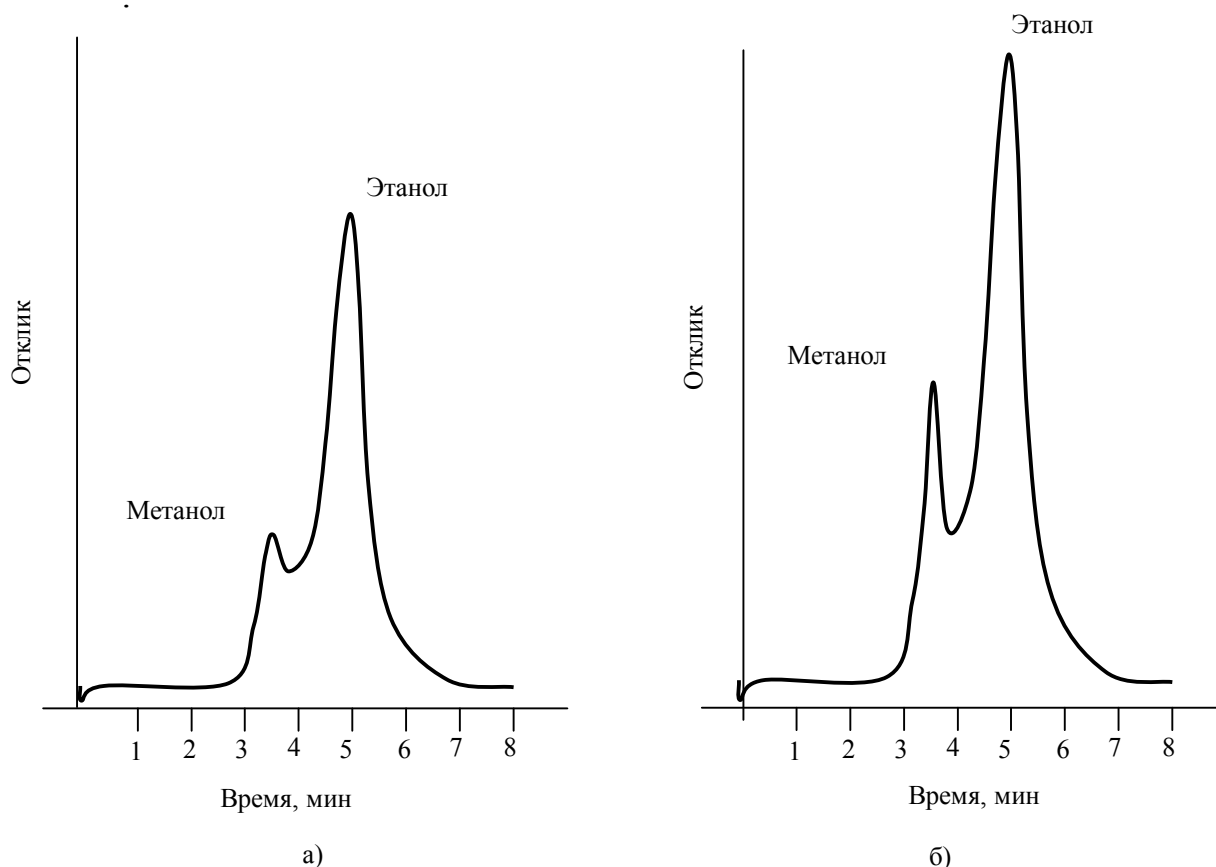


Рис.11. Хроматограммы испытуемой (а) и эталонной (б) смесей

Другой вариант (**метод метки, добавки**) заключается в том, что **в исследуемую смесь вводят эталонный компонент, наличие которого в этой смеси предполагается**. Например, в разделяемой смеси необходимо контролировать присутствие метанола. По методу метки в данном случае снимают хроматограмму анализируемого образца (а), затем добавляют к нему для отождествления пика метанола стандарт метанола и получают повторную хроматограмму (б) (рис.12). Сопоставляя обе хроматограммы,

обнаруживают, что на повторной хроматограмме (б) пик компонента с временем удерживания 3,5 мин значительно увеличился

Следовательно, можно сделать вывод, что метанол в анализируемом образце присутствует, но в небольшом количестве.

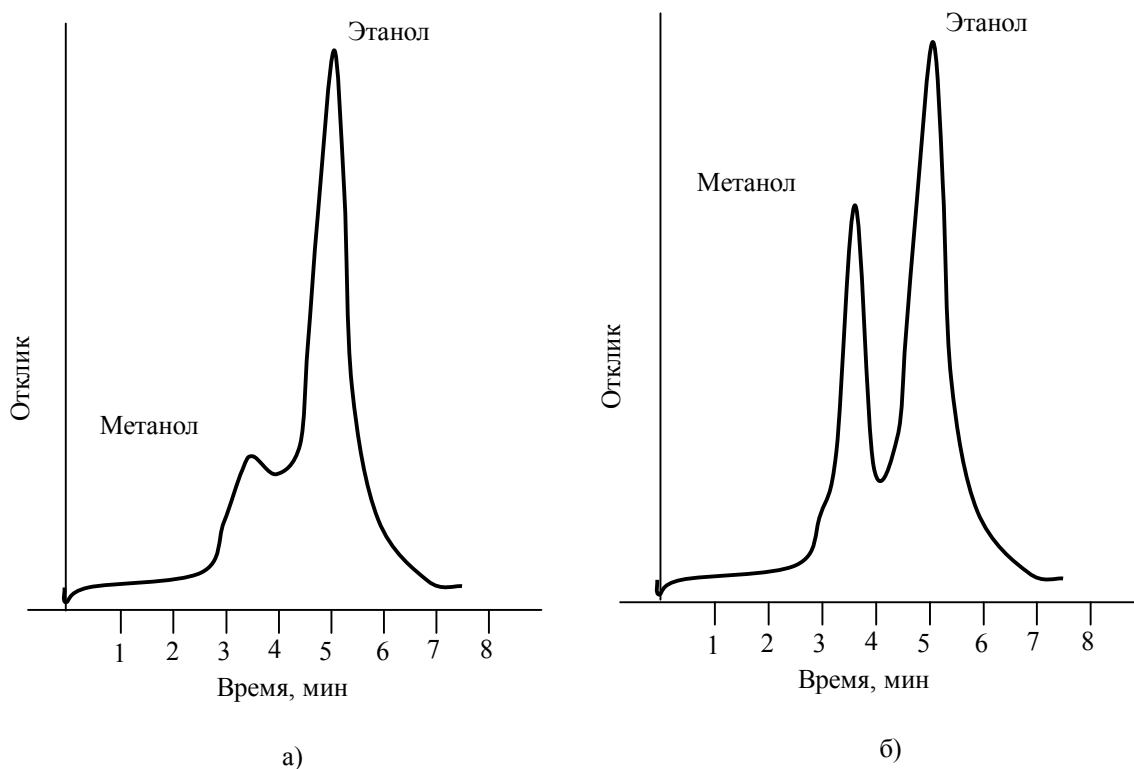


Рис.12. Хроматограммы анализируемой смеси

В настоящее время имеются многочисленные таблицы со значениями относительных удерживаемых объемов для самых различных соединений. Анализируемую смесь разделяют на колонке при условиях, указанных в соответствующей таблице, причем предварительно в смесь вводят небольшое количество веществ, служащих стандартами (например, несорбируемый газ, воздух). На основе полученной хроматограммы рассчитывают относительные удерживаемые объемы или другие характеристики, полученные значения сравнивают с табличными данными.

Эффективным оказалось сочетание газовой хроматографии с **ИК-спектроскопией и масс-спектрометрией**. В первом случае хроматографически выделенные компоненты помещают в кювету спектрофотометра и снимают спектр. По каталогу спектров или по эталонным веществам идентифицируют анализируемые вещества. При идентификации методом масс-спектрометрии хроматографическую колонку соединяют с масс-спектрометром. Полученные масс-спектры сравнивают с имеющимися в каталогах. На основании такого сравнения проводят корректную идентификацию компонентов анализируемой смеси.

1.5. Количественный анализ

Велика потребность в выполнении количественных газохроматографических анализов в практике научно-исследовательских и особенно заводских и территориальных контрольно-аналитических лабораторий.

Количественный газохроматографический анализ позволяет:

- определять содержание одного, нескольких или всех компонентов в многокомпонентной смеси;
- определять суммарное содержание групп из нескольких компонентов, объединяемых каким-либо общим признаком;
- определять микропримеси в индивидуальных химических соединениях.

Основным параметром хроматограммы, характеризующим количество анализируемого компонента, является площадь пика (S).

Однако точное определение площадей пиков не всегда возможно (например, при неполном разделении компонентов). Поэтому при количественной расшифровке хроматограммы вместо площадей пиков могут быть использованы также величины, пропорциональные площади. Каким параметром при количественной расшифровке хроматограмм отдать предпочтение, решается в каждом конкретном случае. Для определения площадей пиков существует несколько приемов. Площадь пика подсчитывается по формуле треугольника планиметрически, с помощью интеграторов, возможно также переводение пиков на однородную бумагу с последующим их взвешиванием.

Упрощенный способ состоит в умножении высоты пика (h) на его ширину, измеренную на расстоянии, равном половине высоты ($w_{0,5}$). Этот способ очень распространен и достаточно точен. Его применение возможно при условии получения симметричных пиков и полном разделении веществ.

Существует три основных метода количественного анализа: **метод абсолютной градуировки, метод внутренней нормализации и метод внутреннего стандарта.**

1.5.1. Метод абсолютной градуировки

Методом абсолютной градуировки чаще всего пользуются в тех случаях, когда есть сомнения в линейной работе детектора и когда нужно определять не все компоненты определяемой смеси, а только один или два, например, при анализе примесей. По этому методу получают хроматограммы определенных количеств известного соединения и строят градуировочный график (рис.13), на одной из осей которого откладывают высоты (или площади) пиков, а на другой – количество введенного вещества (q). Затем на хроматографическую колонку подают точное количество смеси неизвестного состава, измеряют высоту (или площадь) пика определяемого

компонента и по градуировочному графику рассчитывают его количество(q_i).

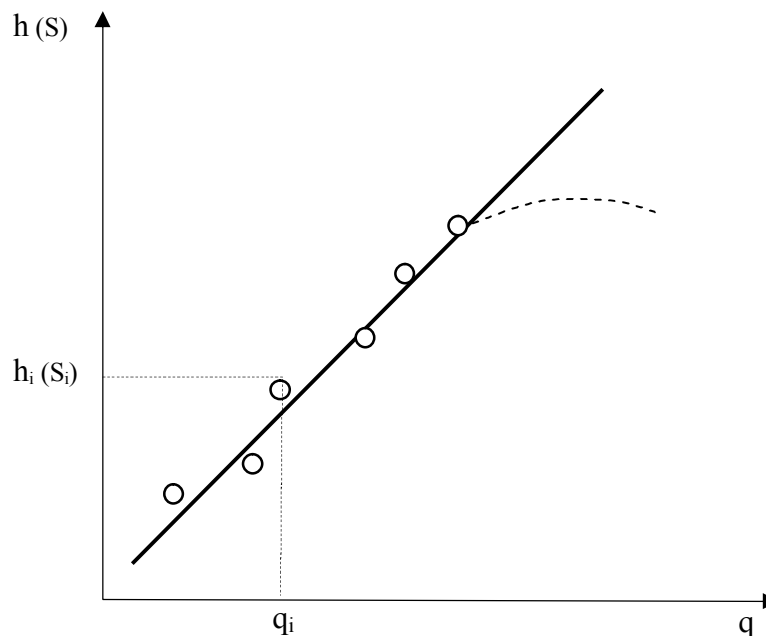


Рис. 13. Градуировочный график

Если зависимость на рисунке 13 линейна, то можно вычислить угловой коэффициент **К** (градуировочный множитель) и определить содержание i -го вещества (%) в пробе по формуле:

$$W_i = K_i \frac{h_i(s_i)}{q_i} 100 ,$$

где W_i – массовая доля определяемого компонента, %;

q_i – величина пробы, мкл или мкг;

K_i – градуировочный множитель;

$h_i(s_i)$ – высота (площадь) пика, мм (мм²).

Необходимым условием реализации метода абсолютной градуировки является соблюдение строго одинаковых условий градуировки и измерений. Наиболее существенными факторами являются точность и воспроизводимость дозирования пробы. Условия хроматографирования (включая режим работы детектора и обработку результатов) должны быть идентичными.

Этот простой и точный метод является основным методом определения микропримесей.

1.5.2. Метод внутренней нормализации

Представим себе идеализированный случай: на хроматограмме зафиксированы три компонента (А, В, С), присутствующие в анализируемой пробе (рис.14).

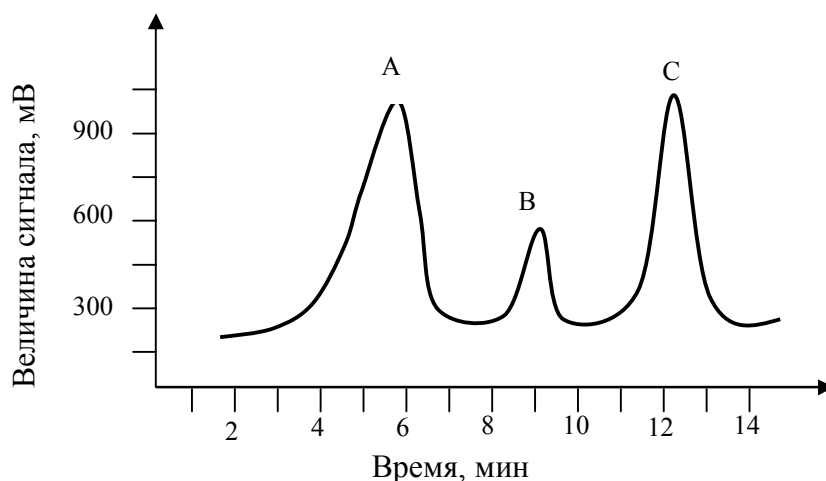


Рис. 14. Хроматограмма

Сигнал детектора линеен во всем диапазоне концентраций, а чувствительность детектора одинакова по отношению ко всем компонентам пробы.

В методе **простой нормировки** сумму площадей всех пиков $S_A + S_B + S_C$ принимают за 100%, тогда отношение площади одного пика к сумме площадей, умноженное на 100%, будет характеризовать массовую долю

(%) компонента смеси: $W_A(\%) = \frac{S_A}{S_A + S_B + S_C} \cdot 100\%$;

$$W_B(\%) = \frac{S_B}{S_A + S_B + S_C} \cdot 100\%;$$

$$W_C(\%) = \frac{S_C}{S_A + S_B + S_C} \cdot 100\%,$$

где W_A , W_B , W_C — массовые доли компонентов А, В, С, соответственно, в процентах.

Этот метод основан на том предположении, что вещества, взятые в одинаковом количестве, дают одну и ту же площадь пика, независимо от их строения. Это приближенно выполняется, если вещества химически сходны, а в качестве газа-носителя применяется газ с высокой теплопроводностью (водород или гелий). Метод простой нормировки не дает точных результатов в случае различной чувствительности детектора по отношению к разделяемым компонентам смеси.

На учете различия чувствительности детектора по отношению к компонентам анализируемой смеси веществ А, В, С основан **метод норми-**

ровки с градуировочными коэффициентами, и поэтому он более надежен, чем предыдущий. В этом случае расчет ведут по формуле:

$$W_i(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=1}^n S_i \cdot K_i} \cdot 100,$$

где K_i – градуировочный коэффициент i -го компонента, который определяют экспериментально или используют литературные данные.

Например, массовая доля в процентах компонента А рассчитывается по формуле:

$$W_A(\%) = \frac{S_A \cdot K_A}{S_A \cdot K_A + S_B \cdot K_B + S_C \cdot K_C} \cdot 100$$

Градуировочные коэффициенты определяют для учета различия в чувствительности детектора для каждого компонента. Градуировку проводят по результатам хроматографирования бинарной смеси, составленной из i -го компонента и стандарта, градуировочный коэффициент которого принимают равным 1. Градуировочные коэффициенты рассчитывают по формуле:

$$K_i = \frac{S_{\text{ст}} C_i}{S_i C_{\text{ст}}} \quad \text{или} \quad K_i = \frac{h_{\text{ст}} C_i}{h_i C_{\text{ст}}}$$

Обычно в литературе приводятся так называемые **поправочные коэффициенты (K_n)**, то есть градуировочные K_i хроматографируемых веществ, отнесенные к градуировочному коэффициенту вещества, выбранного за стандарт ($K_{\text{ст}}$):

$$K_n = \frac{K_i}{K_{\text{ст}}}.$$

Поправочные коэффициенты, в отличие от градуировочных, мало зависят от условий опыта, но зависят от типов используемых детекторов.

Метод внутренней нормализации требует полного разделения и идентификации всех компонентов смеси, необходимости знания градуировочных коэффициентов для всех анализируемых веществ без исключения. Ошибки в определении параметра пика или градуировочного коэффициента какого-либо одного компонента приводят к неверным результатам всего анализа. Поэтому метод внутренней нормализации применяют, главным образом, для рутинных анализов малокомпонентных смесей.

Рассмотрим метод внутренней нормализации на примере определения процентного содержания этанола.

Хроматографируют 3-5 раз образец неизвестного состава (рис.15 а, б, в, г), подбирая чувствительность регистрации сигнала, обеспечивающую наибольшую высоту пиков на хроматограммах, регистрируют хроматограмму и обрабатывают результаты. Измеряют площади пиков воды и спирта, умножая их высоту на полуширину. Затем содержание спирта в процентах рассчитывают по формуле:

$$W_{\text{этанола}} (\%) = \frac{S_{\text{этанола}} \cdot K_{\text{этанола}}}{K_{\text{этанола}} \cdot S_{\text{этанола}} + K_{\text{воды}} \cdot S_{\text{воды}}}$$

Находят средний результат количественного содержания этанола по четырем измерениям, который составляет 95,12 % (рис. 15 а, б, в, г).

Ниже представлены примеры расчетов:

$$\text{а) } S_{\text{этанола}} = h \cdot w_{0,5} \cdot v = 134,0 \cdot 6,1 \cdot 32 = 26371,2 \text{ мм}^2;$$

$$S_{\text{воды}} = 164,0 \cdot 3,6 \cdot 2 \cdot 1,17 = 1381,5 \text{ мм}^2,$$

где 134,0 и 164,0 – высота (h) пиков этанола и воды соответственно, мм;

6,1. и 3,6 – ширина полупиков ($w_{0,5}$), мм;

32 и 2 – чувствительность (v) регистрации сигналов (пиков) этанола и воды соответственно;

1,0 и 1,17 – градуировочные коэффициенты этанола и воды соответственно.

$$W_{\text{этанола}} = \frac{26371,2 \cdot 1,0}{26371,2 \cdot 1,0 + 1381,5 \cdot 1,17} \cdot 100 = \frac{26371,2}{27987,5} \cdot 100 = 94,21\%;$$

$$W_{\text{воды}} = \frac{1381,5 \cdot 1,17}{1381,5 \cdot 1,17 + 26371,2 \cdot 1,0} \cdot 100 = \frac{1616,3}{27987,5} \cdot 100 = 5,79\%.$$

$$\text{б) } S_{\text{этанола}} = 146,0 \cdot 4,8 \cdot 32 = 22502,4 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{этанола}} = 94,89\%;$$

$$S_{\text{воды}} = 167,0 \cdot 3,1 \cdot 2 = 1035,4 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{воды}} = 5,11\%.$$

$$\text{в) } S_{\text{этанола}} = 81,0 \cdot 4,1 \cdot 32 = 10627,2 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{этанола}} = 95,75\%;$$

$$S_{\text{воды}} = 79,5 \cdot 3,7 \cdot 2 = 588,3 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{воды}} = 4,25\%.$$

$$\text{г) } S_{\text{этанола}} = 146,0 \cdot 4,3 \cdot 16 = 10044,8 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{этанола}} = 95,65\%;$$

$$S_{\text{воды}} = 61,0 \cdot 3,2 \cdot 2 = 390,4 \text{ мм}^2;$$

$$W_{\text{воды}} = 4,35\%.$$

1.5.3. Метод внутреннего стандарта

Этот метод известен под названием **относительной или косвенной градуировки** и основан на введении в анализируемую смесь точно известного количества стандартного вещества, не входящего в состав анализируемой пробы и дающего отдельно регистрируемый на хроматограмме последний пик. В качестве стандартного вещества выбирают вещество, удовлетворяющее следующим требованиям:

- оно должно проявляться на хроматограмме в виде пика, хорошо отделенного от остальных пиков; его пик должен стоять на хроматограмме недалеко от веществ, представляющих интерес;
- иметь концентрацию, близкую к концентрации исследуемого компонента;
- иметь строение, близкое к строению исследуемого компонента.

Так, при определении процентного содержания примеси этанола в лекарственных средствах в качестве внутреннего стандарта часто используют изопропанол, гексанол и др.

Метод внутреннего стандарта используют, если при анализе многокомпонентной смеси необходимо определить содержание одного или двух компонентов (чтобы не подсчитывать площади всех пиков).

Вначале по методу внутреннего стандарта хроматографируют специально приготовленные смеси с известным весовым соотношением анализируемого вещества и стандарта и измеряют площади пиков. Затем строят зависимость отношения площадей пиков от величины весового соотношения компонента и стандарта в смеси (рис.16). После хроматографирования измеряют площади пиков анализируемого компонента (S_i) и стандартного вещества ($S_{ст}$).

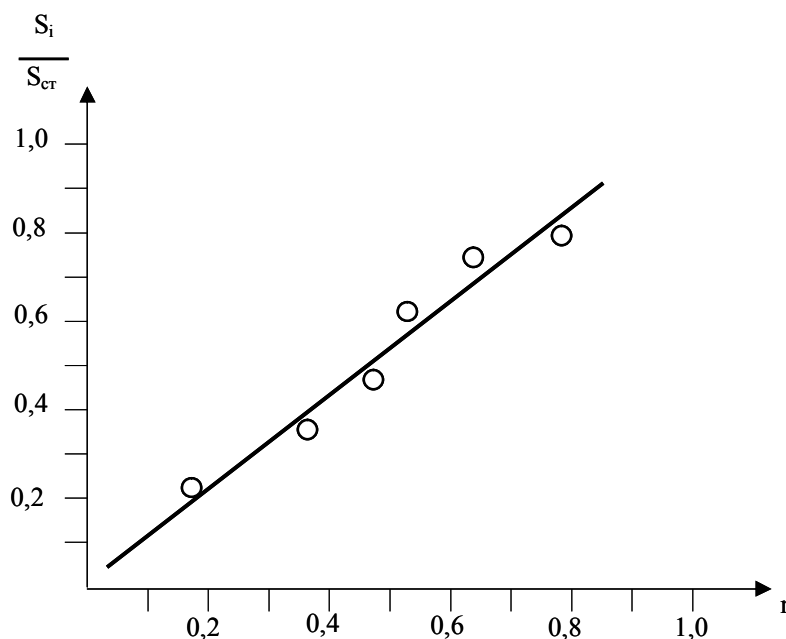


Рис.16. График относительной градуировки

Массовую долю анализируемого компонента $W_i(\%)$ рассчитывают по формуле:

$$W_i(\%) = \frac{K_i S_i}{K_{CT} S_{CT}} 100r = K \frac{S_i m_{CT}}{S_{CT} m_i} 100,$$

где r – отношение массы внутреннего стандарта в смеси к массе анализируемого вещества

$$r = \frac{m_{CT}}{m_i}$$

K_i , K_{CT} , S_i , S_{CT} – градуировочные коэффициенты, площади анализируемого компонента и стандартного вещества..

Рассмотрим метод внутреннего стандарта на примере определения процентного содержания этанола в лекарственном средстве (рис.17 а, б, в). С этой целью хроматографируют 3 раза смеси известных количеств анализируемых образцов лекарственного средства с известным количеством в них изопропанола, взятого в качестве внутреннего стандарта. Определяют на хроматограммах площади пиков этанола и изопропанола, затем по формуле рассчитывают процентное содержание в лекарственном средстве этанола, которое равно 73,79 %; 68,88 %; 68,20%, соответственно. По полученным данным определяют средний результат, который равен 70,26 %.

Основной недостаток указанного метода заключается в трудности подбора стандарта, не мешающего определению интересующего вещества. Метод внутреннего стандарта обладает хорошей воспроизводимостью, высокой точностью, он не требует знания коэффициента чувствительности детектора, так как любое изменение чувствительности не оказывает влияния на величину отношения площадей.

Ниже представлены примеры расчетов:

$$\begin{aligned} \text{а) } S_{i, \text{ этанола}} &= h \cdot w_{0,5} = 141,5 \cdot 4,6 = 650,9 \text{ мм}^2; \\ S_{\text{изопропанола}} &= 100,0 \cdot 5,6 = 560,0 \text{ мм}^2; \\ W_{i, \text{ этанола}} &= 0,98 \cdot \frac{650,9 \cdot 0,5391}{560,0 \cdot 0,8322} \cdot 100 = 73,79\%, \end{aligned}$$

где 0,98 – поправочный коэффициент;

0,5391 и 0,8322 – точные массы стандартного и анализируемого вещества (i) соответственно, г;

$$\begin{aligned} \text{б) } S_{i, \text{ этанола}} &= 130,0 \cdot 4,4 = 572,0 \text{ мм}^2; \\ S_{\text{изопропанола}} &= 92,5 \cdot 5,7 = 527,2 \text{ мм}^2; \\ W_{i, \text{ этанола}} &= 68,88 \%; \\ \text{в) } S_{i, \text{ этанола}} &= 117,5 \cdot 4,3 = 505,2 \text{ мм}^2; \\ S_{\text{изопропанола}} &= 84,0 \cdot 5,6 = 470,4 \text{ мм}^2; \\ W_{i, \text{ этанола}} &= 68,20\%. \end{aligned}$$

В приложении 1 представлены:

- Общая фармакопейная статья (ОФС 42-0004-01). **Остаточные органические растворители**;
- Методика и паспорт анализа **спирта этилового 95%**, определения метанола и других летучих примесей согласно ФС 42-072-00 (Россия);
- Методика и паспорт анализа препарата **диклофенак** в лекарственной форме “раствор для инъекций 25 мг/мл в ампулах по 3 мл” (подлинность и количественное содержание бензилового спирта и пропиленгликоля) согласно НД 42-9360-00 (Индия);
- Методика и паспорт анализа препарата **эналаприла малеат** в лекарственной форме порошок-субстанция (определение органических летучих примесей) согласно НД 42-9121-98 (Индия);
- Методика и паспорт анализа препарата **пенициллин фау (У)** в лекарственной форме порошок-субстанция (определение остаточных растворителей) согласно НД 42-9123-98 (Австрия);
- Методика испытания на подлинность препарата **масло облепиховое** согласно ФС 42-1730-95 (Россия);
- Методика и паспорт анализа препарата **септолете** в препарате пастилки (идентификация и количественный анализ ментола и тимола) согласно НД 42-7706-97 (KRKA, Словения).

1.6. Хромато-масс-спектрометрия

С целью однозначной идентификации фракций, полученных после хроматографического разделения, используют сочетание газовой хроматографии с флуориметрией, УФ-спектроскопией, ИК-спектроскопией, масс-спектрометрией. Наиболее эффективное сочетание возможностей техники разделения и идентификации веществ достигнуто путем объединения в одну систему газового хроматографа и масс-спектрометра. Такая система называется **хромато-масс-спектрометром**, а соответствующий метод анализа **хромато-масс-спектрометрией**.

Масс-спектрометрия дополняет информацию, полученную с помощью других физических методов. Если **УФ-спектр** указывает на тип ароматической системы или сопряженного хромофора, **ИК-спектр** позволяет обнаружить наличие ряда функциональных групп, **ЯМР-спектр** дает информацию об окружении этих групп, то масс-спектрометрические данные позволяют установить положение этих функциональных групп в молекуле и оценить их связь друг с другом.

Кроме того, по данным масс-спектра можно сделать вывод относительно размера и структуры боковых цепей, а также провести прямое определение молекулярной массы с точностью до одной единицы массы. Большим преимуществом хромато-масс-спектрометрии является возмож-

ность использования для анализа незначительного количества исследуемого вещества, не превышающего десятых долей миллиграмма.

Чтобы оценить возможности применения хромато-масс-спектрометрии, необходимо обсудить принцип работы хромато-масс-спектрометра и способы получения масс-спектров.

На рисунке 18 представлена схема хромато-масс-спектрометра.

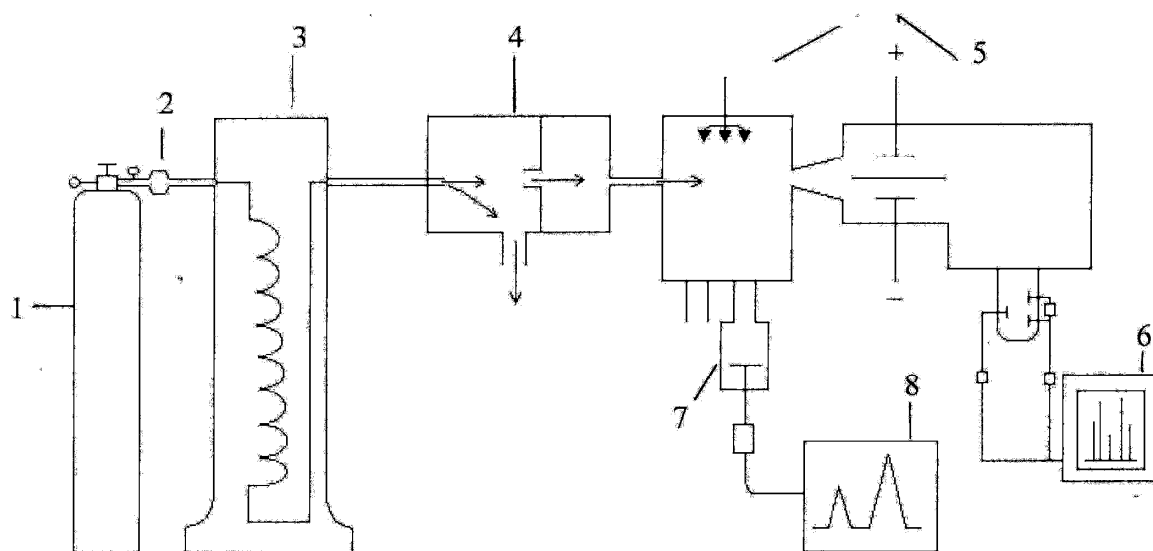


Рис.18. Схема хромато-масс-спектрометра

- 1 – баллон с газом; 2 – ввод пробы; 3 – хроматографическая колонка; 4 – молекулярный сепаратор; 5 – масс-спектрометр;
6 – самописец (масс-спектр); 7 – детектор полного ионного тока;
8 – самописец (хроматограмма).

При выполнении анализа поток газа из хроматографической колонки через специальное устройство (сепаратор) направляется в ионный источник масс-спектрометра. В хромато-масс-спектрометре конституция “молекулярного сепаратора” играет очень большую роль. Работа его заключается в удалении за пределы прибора большей части газа-носителя при одновременном обогащении на несколько порядков оставшейся части газа молекулами хроматографируемых соединений.

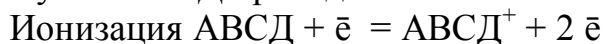
В ионизационной камере, работающей при давлении $1,33 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} Па (10^{-6} - 10^{-5} мм рт.ст.) молекулы компонентов смеси бомбардируются под прямым углом пучком быстрых электронов, испускаемых нагретой нитью. Энергию ионизирующих электронов регулируют, изменяя разность потенциалов между катодом (-) и ионизационной камерой (+). В результате взаимодействия электронов с молекулами анализируемого вещества образуются положительно заряженные ионы, которые фокусируются в почти параллельный пучок и ускоряются системой электронных линз. Возникающие при этом положительные ионы с различными массами зарядов и

энергиями выталкиваются из ионного источника в зону переменного магнитного поля, а примерно 10% от общего количества их отводится в **детектор полного ионного тока**, по показаниям которого записывается хроматограмма анализируемой смеси. Остатки неионизированного газа извлекаются вакуумным насосом. Быстро движущиеся ионы попадают в магнитное поле напряженностью H . При этом в зависимости от массы иона m , его заряда Z и соотношения ускоряющего напряжения U и напряженности магнитного поля H эти ионы начинают двигаться по траекториям различного радиуса, сортируются в пучки ионов по величине отношения массы к заряду (m/Z).

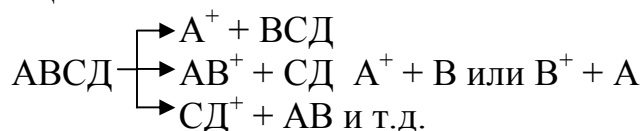
Если изменять напряженность магнитного поля H или потенциал ионизационной камеры U , то можно последовательно выводить через калиброванную щель на коллектор каждый из пучков. На коллекторе ионы разряжаются, за счет чего на сопротивлении создается падение напряжения, пропорциональное числу ионов. Это напряжение усиливается и записывается регистрирующим устройством. Зная H и U , по которым проводится развертка спектра и регистрируется данный пучок ионов, можно определить величину m/Z для составляющих этот пучок ионов. В основе этого определения лежит следующее сравнение статических масс-спектрометров: $m/Z = H^2 R^2 / 2U$.

В качестве коллектора, фиксирующего попадающие на него ионы, могут служить фотографическая пластина, бумага и некоторые другие приборы, на которых регистрируются осциллографом результаты измерения относительного числа ионов, различающихся по значениям отношений массы к заряду, собственно **масс-спектр** вещества.

Бомбардировка молекулы АВСД электронами достаточной энергии (например, при $E = 100$ эВ, скорость электрона $= 5,9 \cdot 10^6$ м/с, время взаимодействия составляет 10^{-17} с) приводит к отщеплению одного электрона и образованию положительно заряженного молекулярного иона $АВСД^+$. Образующийся при электронном ударе молекулярный ион может обладать достаточно большой продолжительностью жизни (10^{-14} с), вследствие чего он успевает получить необходимое ускорение и попасть в коллектор. В таком случае он появляется в спектре при массовом числе, отвечающем его молекулярной массе. Если же при столкновении исходной молекулы с бомбардирующим электроном молекула получает избыточную энергию, по сравнению с потенциалом ионизации, то это может привести к разрыву связи и тем самым к диссоциации молекулярного иона и, следовательно, к его отсутствию в спектре. Возможные результаты столкновения электрона с молекулой АВСД приведены на схеме:

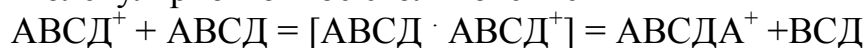


Диссоциация



Перегруппировка $АВСД^+ = АД^+ + ВС$

Молекулярно-ионное столкновение



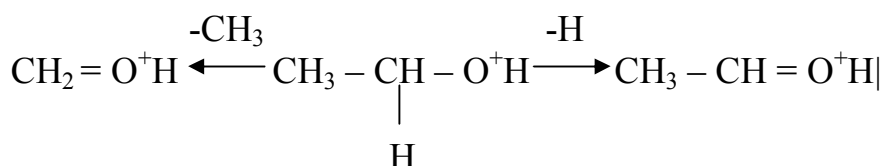
Из приведенной схемы видно, что сложная молекула может дать большое число самых разнообразных осколков и, таким образом, весьма сложный масс-спектр.

Рассмотрим фрагментацию и масс-спектр этанола

Первым процессом, которому подвергается молекула спирта под действием электронного удара, является удаление одного из электронов не поделенной пары атома кислорода с образованием катиона А:



Далее ион – **радикал А** распадается и для этилового спирта возможны два различных пути превращения молекулярного иона в ион оксония, а именно потеря атома водорода или метилрадикала с образованием ионов **В** или **Г**:



Г, m/z31

M⁺ m/z46

В, m/z45

При прочих равных условиях больший заместитель отщепляется лучше, так как неспаренный электрон в радикале стабилизируется легче в более длинной углеродной цепи, в результате перегруппировки или дальнейшего распада. Масс-спектр этилового спирта (рис.19) подтверждает высказанные предположения.

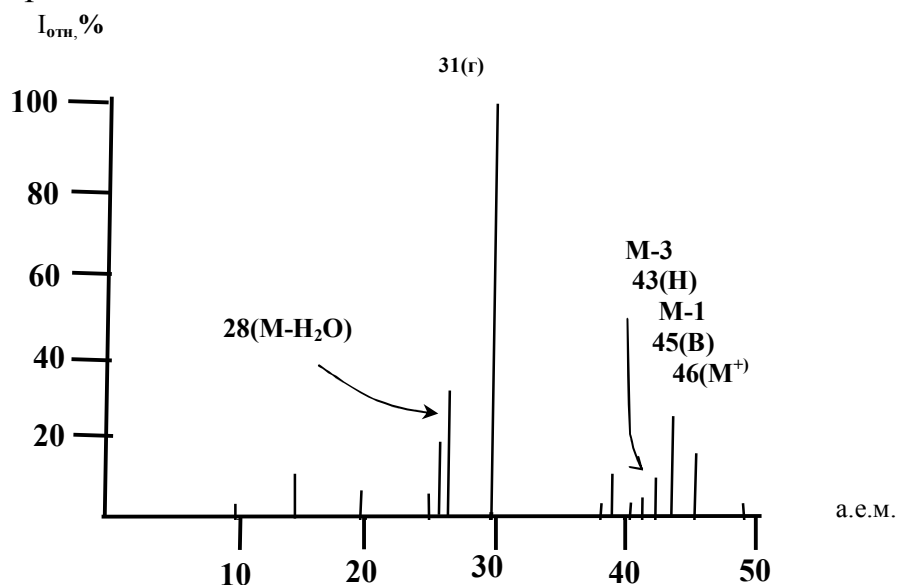


Рис.19. Масс-спектр этилового спирта

В этом спектре пик иона $(M-15)^+$ т.е. $(M-CH_3)^+$ или г, с m/z 31, значительно более интенсивен, чем пик иона в m/z 45, образующегося в результате потери водорода ($M-1$), причем отщепляется атом водорода, связанный с тем же атомом углерода, что и гидроксильная группа.

Для сравнения на рис.20 приведен масс-спектр еще более простого соединения – метилового спирта.

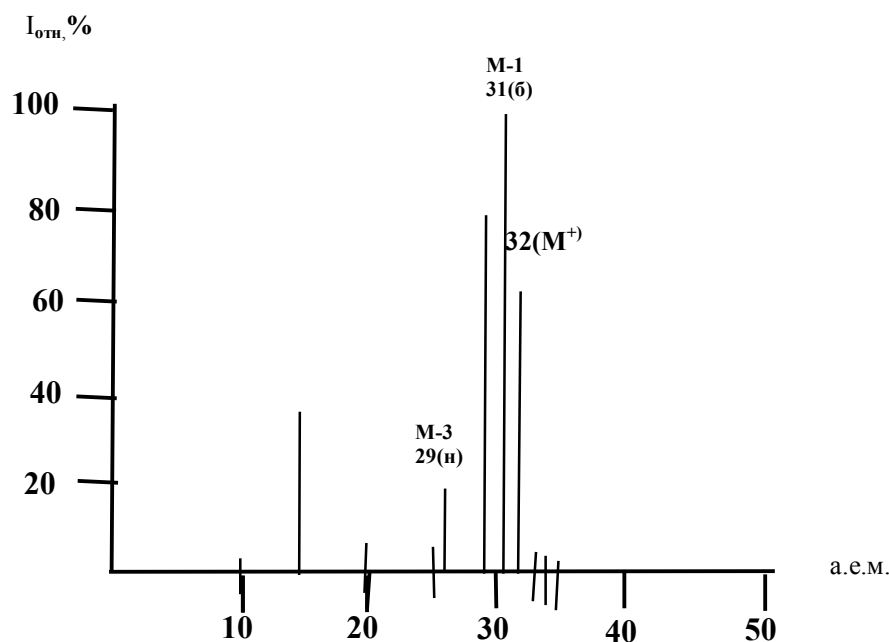


Рис.20. Масс-спектр метилового спирта

Объединение масс-спектрометра с газовым хроматографом дало один из наиболее эффективных современных аналитических методов. Это также область, в которой успешно используется вычислительная техника для оценки результатов анализов. Существуют компьютеризованные системы, которые запоминают хроматограммы и соответствующие спектрограммы. Они могут выбрать из банка данных соответствующее вещество или непосредственно сравнить полученные экспериментальные данные с данными, хранящимися в библиотеке. Такое объединение нашло широкое применение в области медицинских анализов, анализов окружающей среды, где проводится большое число сложных разделений.

1.7. Некоторые сведения о хроматографических приборах

Первое сообщение о стандартном хроматографическом приборе появилось в 1943 году (этот прибор нашел применение для контроля производства синтетического каучука). Серийное производство лабораторных хроматографов началось в 1955 году, когда несколько американских фирм («Perken Elmer», «Burrel Corp.», «Ресо» и др.) практически одновременно выпустили образцы для элюционной газовой хроматографии.

С 1958 года начинается выпуск отечественных хроматографов с высокочувствительными детекторами ионизационного типа и с капиллярными колонками.

Хроматографы «Цвет» — лабораторные хроматографы для решения разнообразных задач аналитического контроля в промышленности и научных исследованиях. В настоящее время используют приборы серии «Цвет-500». Их универсальность определяется в первую очередь набором детектирующих устройств, среди которых детекторы: пламенно-ионизационный, по теплопроводности, электронного захвата, термоионный и пламенно-фотометрический. Анализ ведут на стальных и стеклянных насадочных колонках в изотермическом режиме или при программировании температуры.

Хроматограф «Кристалл 2000М» (АОЗТ СКБ «ХРОМАТЕК», г. Йошкар-Ола, Россия) входит в хроматографический комплекс, включающий сменные модули, сменные аналитические устройства, сервисные устройства, компьютер IBM PC, программное обеспечение.

«Кристалл 2000М» позволяет:

- одновременно работать с двумя колонками различных типов: капиллярными и насадочными;
- одновременное четырёхканальное детектирование с автоматическим перераспределением потока элюата между детекторами;
- использовать полный набор детекторов;
- полностью автоматизировать анализ от ввода пробы, контроля параметров работы до обработки получаемой информации и получения результатов анализа в виде документов;
- управлять несколькими хроматографами с помощью персонального компьютера IBM PC;
- обрабатывать и хранить информацию с нескольких хроматографов.

На рисунке 21 представлен внешний вид хроматографа «Кристалл 2000М».



Рис.21. Внешний вид хроматографа « Кристалл 2000М »

Хроматографы «Хром» (чешского производства «Laboratorní Přístroje») имеют термостат, работающий при температурах до 400°С. В термостате расположены две параллельно работающие колонки, соединенные с камерами дифференциального пламенно-ионизационного детектора или катарометра, закрепленные на съемных крышках.

Пламенно-ионизационный детектор можно преобразовать в термоионный, надев на горелку наконечник из соли натрия, калия, рубидия или цезия. Это позволяет получить повышенную чувствительность к соединениям, содержащим фосфор, азот, галогены и серу (в зависимости от материала наконечника). Прибор может работать при программировании температуры.

Хроматографы «Сигма 4В» – одна из последних моделей, выпускаемых американской фирмой «Perkin-Elmer», прибор обеспечивает работу при изотермическом режиме (до 399°С).

Фирма выпускает также «Станцию хроматографических данных» под названием «Сигма-10», обеспечивающую возможность обработки и хранения данных, поступающих от четырех хроматографов. Система включает интегратор, микропроцессор для автоматизации обработки поступающих данных, печатающее устройство, графопостроитель. С начала 60-х годов 20 столетия газохроматографические приборы стали непосредственно присоединяться к ЭВМ, и в настоящее время на рынке не предлагаются газовые хроматографы без встроенных микро-ЭВМ или без приспособлений для прямого подключения к ЭВМ.

Хроматограф «Hewlett Packard» серии HP 6890 может быть оснащен целым рядом детекторов. Катарометр – универсальный детектор для всех веществ; пламенно-ионизационный – универсальный детектор для органических веществ; электронно-захватный – используется для обнаружения микропримесей пестицидов и гербицидов; пламенно-фотометрический – используется для обнаружения серы, фосфора (анализ загрязнений окружающей среды и биохимических объектов).

Работа хроматографа определена длинным перечнем заданных параметров (температура, время, выбираемые сигналы и т.д.). Эти параметры распределены по управляющим таблицам, на которые с помощью видеоиндикаторов выводятся параметры термостата детектора и т.д. Внешний вид прибора представлен на рис.22.



Рис. 22. Внешний вид хроматографа «Hewlett Packard» серии HP 6890.

Газовый хроматограф «TRACE GC 2000»

- ультрастабильный, малоинерционный термостат;
- полный набор инжекторов, детекторов и автоматических пробоотборников;
- уникальная конструкция блоков инжектора и детектора делает их легкозаменяемыми;
- панель управления позволяет контролировать все параметры прибора и аналитического метода;



Рис. 23. Внешний вид хроматографа

- самодиагностика, поиск утечек и определение характеристик колонки - нажатием одной кнопки;
- возможность установки до двух инжекторов одного или различных типов;
- возможность электронного контроля потока и давления газа-носителя для одного или двух инжекторов;
- система экономии газа-носителя;

- возможность ввода проб большого объема (до 250 мкл) в капиллярную колонку с отдувом растворителя;
- программное обеспечение обеспечивает реализацию концепции "Открытой лаборатории" и позволяет объединять в единый комплекс приборы разных типов и разных производителей.

Вопросы для самоподготовки (ГЖХ)

1. Какое явление лежит в основе ГЖХ? Дайте характеристику процессам, протекающим в хроматографической колонке.
2. Нарисуйте блок-схему современного газового хроматографа, укажите основные узлы.
3. Охарактеризуйте систему подготовки газов.
4. Каким образом вводят анализируемые пробы в хроматографическую колонку?
5. Укажите виды аналитических колонок, их устройство.
6. Укажите назначение твердого носителя. Какие вещества используются для этого?
7. Какие вещества используются в качестве неподвижной фазы? Укажите их функциональное назначение.
8. Охарактеризуйте температурный режим хроматографического процесса.
9. Какие детекторы входят в комплект современного хроматографа?
10. Поясните устройство и работу детектора по теплопроводности и ПИД.
11. Охарактеризуйте критерии хроматографического разделения:
 - Эффективность;
 - Разрешение;
 - Селективность.
12. Укажите основные характеристики хроматограммы, используемые для идентификации анализируемых веществ. Поясните их.
13. Какие факторы влияют на величину объема и время удерживания?
14. Какие величины используют при количественной расшифровке хроматограммы? Какие приемы используют для определения площади пика?
15. Поясните основные методы количественного анализа:
 - Метод абсолютной градуировки;
 - Метод внутренней нормализации;
 - Метод внутреннего стандарта.
16. Укажите преимущества и недостатки газо-жидкостной хроматографии.
17. Назовите марки современных газовых хроматографов.

Тест-контроль

Газожидкостная хроматография

Выберите правильный ответ (один или несколько):

1. В основе ГЖХ лежит:

- А. Различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами;
- Б. Распределение смеси веществ на колонке с сорбентом по отдельным зонам в результате повторения актов сорбции и десорбции при пропускании через колонку газа-носителя;
- В. Сорбция газа-носителя на твёрдом сорбенте колонки;
- Г. Обратимая хемосорбция ионов анализируемого раствора;
- Д. Измерение поглощения электромагнитного излучения.

2. Основными узлами блок-схемы газового хроматографа являются:

- А. Баллон со сжатым газом;
- Б. Блок подготовки газа-носителя;
- В. Испаритель;
- Г. Хроматографическая колонка;
- Д. Дифракционная решётка;
- Е. Детектор;
- Ж. Сосуд для сбора элюента;
- З. Инжектор;
- И. Самописец.

3. В качестве газа-носителя используют:

- А. Водород;
- Б. Кислород;
- В. Гелий;
- Г. Азот;
- Д. Озон.

4. Различают следующие виды колонок:

- А. Насадочная;
- Б. Микронасадочная;
- В. Ионообменная;
- Г. Ротационная;
- Д. Капиллярная.

5. В качестве твёрдых сорбентов применяют:

- А. Диатомит;
- Б. Кизельгур;
- В. Тефлон;
- Г. Полистирол;
- Д. Кварц;
- Е. Крахмал.

6. В качестве неподвижной жидкой фазы используют:

- А. Вазелиновое масло;
- Б. Сложные эфиры;
- В. Силоксановые полимеры с привитыми функциональными группами;
- Г. Полигликоли;
- Д. Воду.

7. Температурный режим:

- А. Комнатная температура;
- Б. Изотермический;
- В. Программирование температуры;
- Г. Температура кипения воды.

8. Детектор предназначен:

- А. Для обнаружения изменений в составе газа, прошедшего через колонку;
- Б. Для разделения веществ;
- В. Для идентификации соединений.
- Г. Для обнаружения состава жидкой фазы в хроматографической колонке.

9. Для анализа веществ используют детекторы:

- А. По теплопроводимости;
- Б. Пламенно-ионизационный;
- В. Электронно-захватный;
- Г. Пламенно-фотометрический
- Д. Рефрактометрический;
- Е. Потенциометрический.

10. Для оценки хроматографического разделения используют следующие критерии:

- А. Степень разделения (селективность);
- Б. Критерий селективности жидкой фазы;
- В. Разрешение;
- Г. Эффективность;
- Д. Чувствительность.

11. ГЖХ используют в фармацевтическом анализе для целей:

- А. Идентификации веществ;
- Б. Определения удельного вращения оптически активных веществ;
- В. Обнаружения примесей;
- Г. Количественного определения компонентов сложных смесей;
- Д. Определение биологической активности веществ;
- Е. Установления устойчивости веществ.

12. Качественный анализ проводится:

- А. Методом приведенных удерживаний (объёмное время);
- Б. Методом введения веществ-свидетелей;
- В. Методом проявления химическими реактивами;
- Г. Методом относительных времен удерживания.

13. Характеристика времени удерживания

- А. Время от момента ввода пробы в хроматографическую колонку до момента выхода из неё максимальной концентрации определяемого вещества;
- Б. Время от момента ввода пробы в хроматографическую колонку до момента выхода последнего компонента;
- В. Время от момента ввода пробы до момента выхода растворителя;
- Г. Время окончания работы хроматографа.

14. Количественный анализ позволяет:

- А. Определить содержание одного, нескольких или всех компонентов в многокомпонентной смеси;
- Б. Определять суммарное содержание нескольких компонентов, объединённых каким-либо общим признаком;
- В. Определить микропримеси в индивидуальных химических соединениях;
- Г. Определить содержание лабильных соединений.

15. Параметром хроматограммы, характеризующим количество анализируемого компонента, является:

- А. Площадь пика;
- Б. Высота пика;
- В. Произведение высоты пика на время удерживания;
- Г. Ширина полупика.

16. Основными методами количественного анализа служат:

- А. Метод установления подвижности веществ;
- Б. Метод абсолютной градуировки;
- В. Метод внутренней нормализации;
- Г. Метод измерения интенсивности полос поглощения;
- Д. Метод внутреннего стандарта.

17. Подсчет площади пика осуществляют:

- А. По формуле треугольника;
- Б. С помощью планиметра;
- В. Используя интеграторы;
- Г. Переведением пиков на однородную бумагу с последующим взвешиванием их в 1 см² этой бумаги;
- Д. Используя электронный усилитель.

18. К преимуществам ГЖХ относится:

- А. Высокая чувствительность;
- Б. Хорошая воспроизводимость;
- В. Точность;
- Г. Универсальность;
- Д. Возможность анализа термически неустойчивых соединений;
- Е. Селективность.

Ответы к тест-контролю (ГЖХ)

- 1. А, Б
- 2. А, Б, В, Г, Е, З, И
- 3. А, В, Г
- 4. А, Б, Д
- 5. А, Б, В, Г
- 6. А, Б, В, Г
- 7. Б, В
- 8. А, В,
- 9. А, Б, В,
- 10. А, Б, В, Г, Д
- 11. А, В, Г
- 12. А, Б, Г
- 13. А
- 14. А, В
- 15. А, Б
- 16. Б, В, Д
- 17. А, Б, В, Г
- 18. А, Б, Г, Е

ГЛАВА 2. Жидкостная хроматография

В жидкостной хроматографии характер протекающих процессов в **хроматографической** колонке в общем случае идентичен с процессами в ГХ. Отличие состоит в применении в качестве подвижной фазы **жидкости**, т.е. жидкостная хроматография – это метод разделения смесей веществ в потоке жидкости на поверхности твердого вещества. Подвижной фазой (ПФ) является жидкость, а неподвижной фазой (НФ) является либо тонко измельченная твердая основа, либо жидкость, нанесенная на твердую подложку, либо твердый носитель, химически модифицированный путем введения органических групп.

В связи с высокой плотностью жидких ПФ и большим сопротивлением колонок ЖХ сильно отличается по аппаратному оформлению от ГХ.

ЖХ как метод была открыта в 1903 году русским ученым ботаником и физико-химиком М.С. Цветом, который использовал для разделения растительных пигментов на их составляющие колонки, заполненные порошком мела.

Позже, благодаря широкому изучению процессов кинетики и термодинамики разделения веществ, созданию оборудования, позволяющего осуществить непрерывный и автоматизированный контроль, появляется разновидность жидкостной хроматографии – **высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ)**. Этому посвящено много работ Муре (Moore S.), Спаркмана (Sparkman D.H.), Хорвата (Horvath C.) и многих других ученых.

2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления)

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления, скоростная жидкостная хроматография начала развиваться в начале 70-х годов XX века. Разработка нового метода обуславливалась следующими обстоятельствами:

- необходимостью анализа высококипящих ($>200^{\circ}\text{C}$) или неустойчивых соединений, которые не разделяются методом газовой хроматографии;
- необходимостью увеличения скорости разделения и повышения эффективности метода колоночной жидкостной хроматографии.

ВЭЖХ в настоящее время не только в значительной степени вытеснила классические КХ, ТСХ, БХ, но и обогнала по темпам развития ГХ. Это обусловлено рядом присущих ей преимуществ.

Преимущества ВЭЖХ:

1. Возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам.

2. Большой диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать (от нескольких единиц до десятков миллионов), что существенно шире, чем в ГХ.
3. Мягкость условий ВЭЖХ, когда разделение можно проводить при температурах близких к комнатной, при отсутствии контакта с воздухом, делает ее особенно пригодной, а иногда единственным методом исследования лабильных соединений (БАВ и биополимеров).
4. Высокая эффективность разделения (которая составляет 200 000 т.т. на 1 м) существенно превосходит таковую в ГХ.
5. Экспрессность анализа: обычно разделение сложной смеси в ВЭЖХ занимает несколько минут.
6. Высокая чувствительность ВЭЖХ в ряде случаев превосходит чувствительность в ГХ, а высокоселективные детекторы позволяют определить микроколичества веществ в сложных смесях.
7. Возможность автоматизации разделения и анализа сложных смесей органических и неорганических веществ. В настоящее время в лабораториях имеются полностью автоматизированные хроматографы, которые дают возможность не только автоматически дозировать и проводить хроматографическое разделение целой серии образцов, но и оценивать хроматограммы с помощью предварительной градуировки.

ВЭЖХ представляет хорошо оформленный инструментальный метод, который широко применяют в различных областях науки и техники: биохимия, молекулярная биология, фитохимия, контроль загрязнения окружающей среды, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности.

ВЭЖХ – серийный метод определения органических соединений многих классов; его широко используют при анализе смесей аминокислот, белков, различных лекарственных средств с целью установления их подлинности, чистоты и количественного содержания.

Высокоэффективная жидкостная хроматография выполняется под повышенным давлением жидкости до 666,5 кПа (500 атм.).

Разделение смеси происходит в колонке, заполненной сорбентом с очень малым размером зерен (3-5 мк), и это является основной особенностью ВЭЖХ, поскольку обеспечивает быстрый перенос при высокой эффективности разделения.

Важной особенностью ВЭЖХ (в отличие от ГЖХ) является возможность проведения процесса при комнатной температуре, что ценно при исследовании белков, аминокислот и других неустойчивых соединений.

Разделение смеси достигается за счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам. Основными требованиями в методе является растворимость исследуемых веществ в подвижной фазе (ПФ), а также свойство удерживаться неподвижной фазой (НФ). Если при вводе пробы какие-либо компоненты смеси окажутся нерастворимыми, они будут отфильтрованы и уже не участвуют в хроматографическом про-

цессе. Точно также не будут разделяться компоненты, не удерживающиеся НФ, так как они пройдут через колонку с НФ.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на **адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзионную.**

В **адсорбционной** хроматографии разделение веществ, входящих в смесь и движущихся по колонке в потоке растворителя, происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться на поверхности адсорбента с развитой поверхностью, например SiO_2 .

В **распределительной** ВЭЖХ разделение происходит за счет различия в растворимости разделяемых веществ в НФ, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и ПФ – растворителе. Этот метод разделения наиболее распространен, особенно в случае, когда привитая фаза представляет собой неполярный алкильный остаток ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$), а ПФ – более полярна, например, является смесью CH_3OH или CH_3CN с водой. Этим вариантом **обращенно-фазовой** хроматографии в настоящее время проводят около 2/3 разделений в ВЭЖХ.

В **ионообменной** хроматографии молекулы вещества смеси, диссоциирующие на катионы и анионы в растворе, разделяются при движении через сорбент, на котором привиты катионные или анионные центры, способные к обмену с ионами анализируемых веществ за счет их разной скорости обмена.

В **эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной)** хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры носителя. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (имеющие наибольшую молекулярную массу), способные проникать в незначительное число пор носителя. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры сорбента.

Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, адсорбционное разделение бывает осложнено распределительными эффектами и наоборот.

Хроматография – динамичный равновесный процесс, включающий на молекулярном уровне распределение молекул растворенного вещества между подвижной и неподвижной фазами. Малейшее различие в относительном сродстве близких, но различных молекул растворенной смеси веществ по отношению к обеим фазам, умноженное на многократный фазовый перенос, который происходит при прохождении молекулы через хроматографическую колонку, приводит к заметному различию удерживания компонентов образца. Поэтому выбор оптимальной комбинации ПФ и НФ с целью добиться максимального относительного различия между их сродством к компонентам образца имеет наибольшее влияние в целях разделения в ВЭЖХ.

Жидкостно-адсорбционная хроматография широко представлена в двух вариантах: **нормально-фазовая (НФХ)** и **обращенно-фазовая (ОФХ)** – в зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз.

В нормально-фазовой хроматографии используют полярный адсорбент (например, силикагель) и неполярный элюент (гексан, хлороформ и др.), а разделяемые вещества – полярные.

В обращенно-фазовой хроматографии, как правило, адсорбент неполярный – силикагель с привитыми на его поверхности алкильными цепями (C_8 - C_{18}), элюент полярный (спирты, ацетонитрил, вода), а разделяемые вещества могут быть любой природы. Этим вариантом обращенно-фазовой хроматографии в настоящее время проводят около $2/3$ разделений в ВЭЖХ.

Растворители в порядке возрастания полярности располагаются следующим образом: петролейный эфир, циклогексан, тетрахлорметан, бензол, метилхлорид, хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, *n*-пропанол, этанол, метанол, вода, уксусная кислота.

По масштабу ВЭЖХ делится на **микроколоночную** (колонки диаметром менее 2 мм), **аналитическую** (2-6 мм), **полупрепаративную** (7-10 мм), **препаративную** (10-40 мм) и **крупномасштабную** (более 40 мм).

2.1.1. Характеристика микромасштабной ВЭЖХ

В последнее десятилетие исследования в области миниатюризации колонок для ВЭЖХ привлекают внимание многих хроматографистов, что обусловлено преимуществами, присущими микромасштабной ВЭЖХ.

Этот метод позволяет:

- проводить разделение с малодоступными соединениями, поскольку расход ПФ и НФ в этом случае мал;
- повысить чувствительность;
- достичь высокой эффективности разделения при использовании длинных колонок;
- обеспечить с высокой точностью достижение заданных условий разделения;
- упростить программирование температуры;
- наиболее эффективно применить масс-спектрометрию (МС) для обнаружения разделенных соединений, т.е. использовать высокочувствительный гибридный метод. Чем меньше расход ПФ, тем легче осуществляется прямое сочетание ЖХ с МС.

Очевидно, что с уменьшением размеров колонки снижается расход НФ. Это позволяет, с одной стороны, применять труднодоступные и дорогие насадки и длинные колонки, а с другой — упрощать работу с токсичными и пожароопасными подвижными фазами.

Микро-ВЭЖХ позволяет повысить чувствительность обнаружения, так как при одинаковой эффективности разделения компонентов на колонках различного диаметра концентрация элюируемых из колонки компо-

нентов обратно пропорциональна квадрату ее внутреннего диаметра. Указанное обстоятельство весьма важно при определении примесей в лекарственных препаратах.

Кроме того в микро-ВЭЖХ, благодаря уменьшению вихревой диффузии и более эффективному отводу тепла, выделяющегося вследствие перепада давления, увеличение длины колонки позволяет достигнуть высокой эффективности системы. Как известно, выделяющаяся в колонке теплота влияет на процессы массопереноса, ухудшая эффективность разделения. Чтобы избежать этого, следует поддерживать постоянной температуру в колонке. В этом заключается одно из преимуществ микро-ВЭЖХ, так как малая теплоемкость микроколонок упрощает программирование температуры.

2.1.2. Классификация методов микро-ВЭЖХ

Методы микро-ВЭЖХ классифицируются в соответствии с типом насадки и размерами колонок. Колонки для микро-ВЭЖХ разделяют на три категории в зависимости от типа насадки:

- 1) плотно упакованные колонки;
- 2) свободноупакованные колонки;
- 3) открытые безнасадочные колонки.

Колонки с плотной набивкой обычно подразделяют на 3 категории в зависимости от их диаметра: колонки для обычной ВЭЖХ, для полумикро- и микро-ВЭЖХ (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Наиболее употребительные диаметры колонок и объемные скорости ПФ для разных типов ВЭЖХ

Тип ВЭЖХ	Тип колонки	Внутренний диаметр, мм	Объемная скорость, мкл/мин
Обычная	С плотной набивкой	4,6	1000
Полумикро-	С плотной набивкой	1,5	100
Микро-	С плотной набивкой	0,46	10
Ультрамикро-ВЭЖХ	Свободно упакованные (насадочные капиллярные)	0,15	1
	Открытые безнасадочные (капиллярные)	0,01-0,06	1

В обычной ВЭЖХ и полумикро-ВЭЖХ разделение чаще всего проводится на колонках из нержавеющей стали, тогда как в микро-ВЭЖХ пользуются колонками из обычного или кварцевого стекла и политетрафторэтилена. Для изготовления открытых и насадочных капиллярных колонок применяются также капилляры из мягкого стекла (пирекса).

Колонки, объем которых составляет одну сотую или меньше объема обычной колонки, называют микроколонок, а колонку объемом примерно в одну десятую объема обычной колонки – полумикроколонок. Особенности указанных колонок является то, что объем пика, объемная скорость элюента и суммарный расход элюента для микроколонок в 100 раз, а для полумикроколонок – в 10 раз меньше, чем для обычных колонок, а концентрация определяемого компонента в максимуме пика в указанное количество раз больше, чем для обычных колонок.

Для достижения высокой эффективности микроколонок очень важно, чтобы мёртвые объемы (незаполненный сорбентом объём колонки – пустоты) в хроматографической системе были сведены к минимуму. При соблюдении этого условия внеколоночное размывание пика не ухудшит разделения, достигнутого в колонке. Размывание пика в системе ВЭЖХ обусловлено несколькими причинами, главными из которых являются дисперсия в ламинарном потоке и эффекты диффузии и перемешивания в камере.

Рассчитано, что скорость движения компонента в центре трубки круглого сечения вдвое превышает среднюю скорость потока. В то же время на стенке трубки скорость потока минимальна и равна нулю. Поэтому молекулы пробы, попавшие на стенки трубки, оставались бы там всегда, если бы не существовал радиальный массоперенос, который осуществляется благодаря молекулярной диффузии, которая в жидкости происходит очень медленно. В результате оставшаяся часть компонента, попавшая на стенки трубки, медленно диффундирует в направлении уменьшения концентрации и при этом увлекается потоком. Таким образом, расстояние между опередившей и отставшей порциями компонента и определяет дисперсию, что схематически изображено на рис. 24.

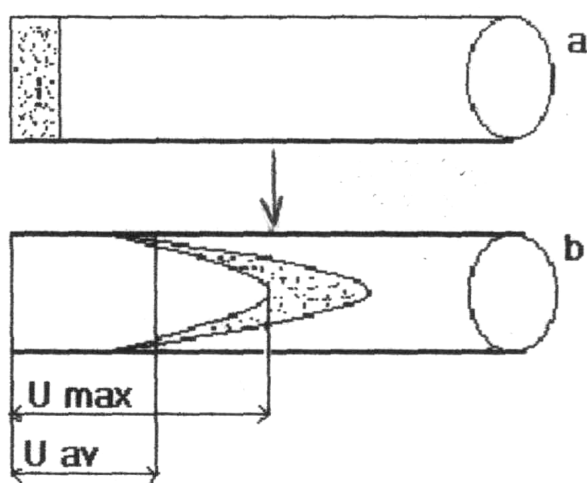


Рис. 24. Схематическое изображение дисперсии ламинарного потока

Компонент вводится в колонку в виде прямоугольной зоны (а). В процессе перемещения по трубке форма зоны изменяется вследствие параболического профиля скоростей потока (б).

U_{max} – максимальная скорость потока в центре трубки;

U_{av} – средняя скорость потока (от англ. average – средняя величина).

Эффективность разделения зависит также от вводимого объема проб и характера использованного при этом растворителя.

Если проба растворена в растворителе менее полярном, чем подвижная фаза, то она вначале концентрируется в головной части колонки и лишь затем начинается ее элюирование. В этом случае вводимый объем может превышать допустимый расчетный; к заметному размыванию пика это не приведет.

Наоборот, если проба растворена в растворителе более полярном, чем ПФ, то объем пробы должен строго соответствовать максимально допустимой расчетной величине. И, наконец, третий вариант: если проба растворена в очень полярном растворителе, он может принять участие в самом процессе элюирования, в результате чего время удерживания окажется меньше ожидаемого. **Поэтому пробу следует растворять в том же растворителе, который выполняет роль ПФ или входит в ее состав, либо, что предпочтительнее, в менее полярном растворителе.**

Высокоэффективная жидкостная хроматография является удобным способом разделения, препаративного выделения и проведения количественного и качественного анализов нелетучих, термолабильных соединений как с малой, так и с большой молекулярной массой.

2.1.3. Принцип анализа методом ВЭЖХ

Анализируемую смесь растворяют в ПФ и с помощью дозатора или микрошприца вводят в специальное устройство прибора. Туда же подаётся под определённым давлением и с определённой скоростью ПФ. По мере продвижения ПФ с растворёнными в ней веществами за определённый промежуток времени на колонке происходит разделение смеси. Чем больше сродство компонента к ПФ и чем меньше к подвижной, тем медленнее он движется по колонке и тем дольше он в ней удерживается.

Анализ проводится в определённом режиме температур, что создаётся с помощью устройства для термостатирования.

На рис. 25 представлена блок-схема современного жидкостного хроматографа.

Растворитель (элюент) из емкости (1) насосом (2) подается в колонку (7). В зависимости от типа насоса поток жидкости при необходимости можно сгладить демпфирующим устройством (4). В том месте, где давление может быть наибольшим (обычно непосредственно за насосом), следует установить предохранительный вентиль (3). Подвижная фаза (растворитель) после демпфирования подается через устройство для ввода пробы (6) в разделительную колонку (7). Давление на входе в разделительную колонку измеряют манометром (5), входящие из колонки составные части пробы определяют с помощью детектора (8), хроматограмма регистрируется самописцем (9).

Если составные части пробы необходимо выделить, то элюат собирают с помощью коллектора фракций (10). Предусмотрена возможность

термостатирования (11) узла для ввода пробы, колонки и детектора, чтобы можно было работать при постоянной температуре, отличающейся от комнатной. ПФ (растворитель) до ввода пробы следует термостатировать при температуре колонки.

Рассмотрим подробнее устройство и функции отдельных узлов жидкостного хроматографа.

Емкость для элюента

Объем сосуда составляет примерно 1000 мл. Емкость для элюента имеет нагреватель, регулятор температуры и магнитную мешалку. Пары элюента конденсируются в холодильнике. Расположение и конструкция сосуда позволяет осуществлять легкую смену элюента. В комплекте прибора может быть несколько емкостей.

Система подачи элюента включает ряд дополнительных узлов; систему дегазации, устройство для создания градиента (смеситель), насосы и измерители давления. Тщательная дегазация всех используемых растворителей необходима ввиду того, что появление пузырьков газа в детекторе делает его использование невозможным

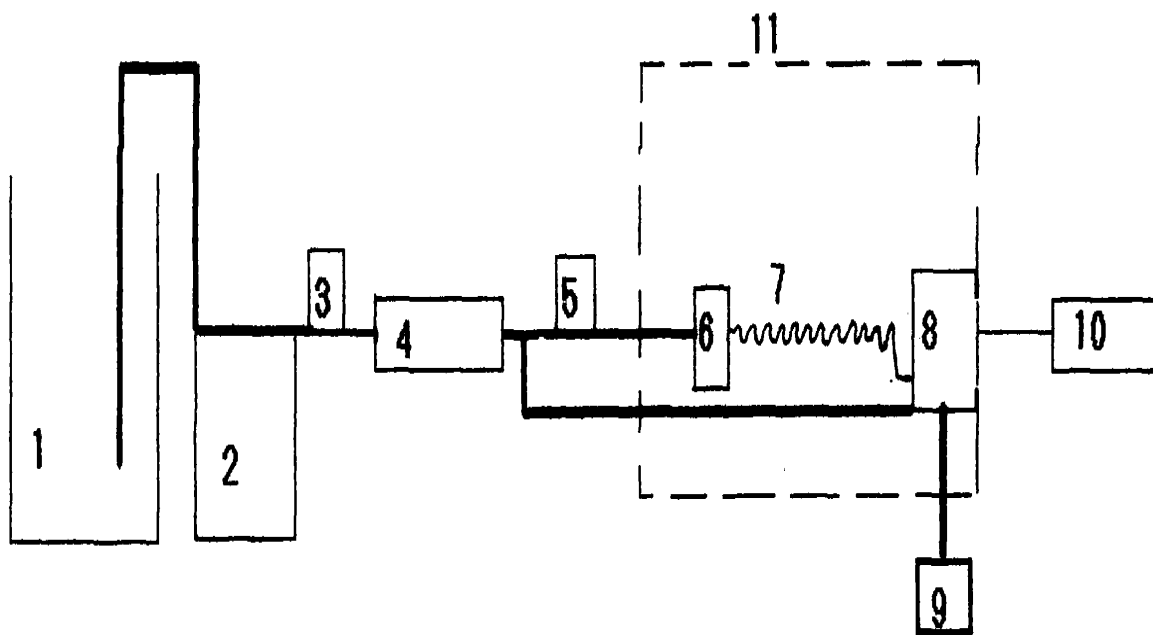


Рис. 25. Блок-схема хроматографа для жидкостной хроматографии при высоких давлениях

1 – сосуд для элюента; 2 – насос или другой источник давления; 3 – предохранительный вентиль; 4 – демпфирующее устройство; 5 – манометр; 6 – устройство для ввода пробы; 7 – хроматографическая колонка; 8 – детектор; 9 – самописец; 10 – коллектор фракций; 11 – термостат.

Насос

Жидкостный хроматограф имеет достаточно сложное градиентное устройство, обеспечивающее отбор элюентов из 2-3 емкостей в смеситель, затем в колонку, а также дозаторы, работающие при высоких давлениях.

Элюент должен подаваться в колонку при высоких давлениях, непрерывно и без пульсаций. Для аналитических работ (внутренний диаметр колонок до 5 мм) насосы должны обеспечивать подачу элюента со скоростью от 0,1 до 10 мл/мин при давлении примерно от 200 до 300-500 атм. В некоторых микроколоночных хроматографах применяются насосы сравнительно низкого давления (до 10-20 атм.)

Ввод пробы

Анализируемые пробы тщательно подготавливают, используя мембранные фильтры толщиной в несколько нанометров. Пробу вещества вводят в поток элюента с помощью микрошприца через прокладку из специальных ненабухающих полимерных материалов в блок для ввода пробы (дозатор) или используют петлю для ввода пробы, из которой пробу вымывают в систему элюентом. Часто используют дозатор с остановкой потока. Проба должна попадать в колонку без значительного смешивания с элюентом, то есть ее нужно вводить шприцем непосредственно в начало разделительной колонки. Кроме того, давление или скорость потока в разделительной колонке при введении пробы не должны нарушаться.

Хроматографическая колонка

В качестве колонок используют чаще всего трубки из нержавеющей стали, а также стеклянные трубки длиной 10-25 см. Внутренний диаметр аналитических разделительных колонок составляет обычно 0,4-0,5 см. Они заполняются адсорбентом с диаметром частиц 5-10 мкм сферической или неправильной формы с помощью суспензионного метода, что дает возможность получить более равномерную и плотную упаковку частиц сорбента в колонке. Заполнение колонки проводится при давлениях, больших, чем рабочее давление в хроматографе.

В микроколоночных хроматографах используются колонки меньшей длины и меньшего внутреннего диаметра (0,1-0,2 см и меньше). Частицы адсорбента не должны разрушаться при заполнении колонки под большим давлением.

Плотная упаковка частиц адсорбента малого диаметра (5-10 мкм) в колонке позволяет получить высокоэффективное хроматографическое разделение компонентов смеси. Частицами диаметром менее 10 мкм заполняют только прямые колонки. Обычно длина таких колонок 10-50 см. Чаще всего разделение проводят в интервале температур 20-50⁰ С, с точностью $\pm 0,1^0$ С.

Адсорбент – это пористые частицы с различным размером пор. В качестве сорбента в ВЭЖХ используют чаще тонкоизмельченный силикагель (**нормально-фазовая хроматография**) или его производные, полученные в результате химической модификации силикагеля (**обращенно-фазовая хроматография**). Немодифицированный силикагель обладает высокими полярными свойствами. Силикагель с привитыми к поверхности C_8 - C_{18} алкильными или другими функциональными группами обладает поверхностью, специфичной к различным классам разделяемых соединений. В ВЭЖХ в качестве сорбента в колонках часто используют Сепарон С18 (силикагель с привитой алкильной группой с числом углеродных атомов, равным 18).

Наполнительные материалы в ВЭЖХ могут иметь различную структуру, в зависимости от цели использования. Например, для препаративных разделений применяют полностью пористые частицы, обеспечивающие высокую емкость, для аналитических разделений – пеликулярные частицы, обеспечивающие высокую эффективность.

В качестве ПФ применяют жидкость, обладающую неполярными свойствами, в случае НФХ и полярными при использовании ОФХ. Основным принципом при выборе ПФ: чем прочнее элюент адсорбируется на ПФ, тем больше его элюирующая способность. Для элюента используются растворители наибольшей степени очистки, а смешивание компонентов должно быть точным по массе или объему. При НФХ разделение осуществляется в смеси органических неводных растворителей. Для этого метода предписывается применение осушенных (безводных) растворителей – гексана, хлороформа, эфира, абсолютного этанола и др. Способы обезвоживания довольно трудоемки (перегонка над металлическим натрием, над специальными цеолитами, перегонка в вакууме).

Использование обращенной фазы имеет ряд преимуществ по сравнению с немодифицированным силикагелем: лучшая воспроизводимость времен удерживания разделяемых компонентов, быстрая устанавливаемость равновесия системы. Обычно в качестве ПФ в ОФХ применяют смеси воды и органического модификатора – ацетонитрила, метанола, изопропанола, тетрагидрофурана и др. Вода должна подвергаться специальной очистке и иметь квалификацию “Для хроматографии”.

По качественным показателям разделения веществ, таким как число теоретических тарелок, ВЭТТ, коэффициент емкости, селективность, разрешение, время выхода вещества, подбираются необходимый состав и соотношение компонентов ПФ.

Состав элюента может быть постоянным на протяжении всей хроматографической процедуры (**изократическое элюирование**) либо различным в соответствии с установленной программой (**градиентное элюирование**).

Градиентное элюирование – большое достоинство жидкой хроматографии, оно позволяет разделять смеси различной полярности за счет изменения коэффициента распределения. Градиентное элюирование мож-

но рассматривать как аналог программирования температуры в газовой хроматографии.

Температура хроматографических колонок поддерживается постоянной во время выполнения эксперимента, поэтому их помещают в термостат.

Детекторы

Состав элюата, вытекающего из колонки, непрерывно контролируют детектором. В каждом хроматографе должно быть по крайней мере два различных детектора. Один из них измеряет по дифференциальной схеме свойство элюата (показатель преломления, диэлектрическую проницаемость), другой должен специфично распознать исследуемые вещества. К группе специфических причисляют УФ-детекторы, полярографические детекторы, детекторы по измерению радиоактивности. Чаще всего используются ультрафиолетовый детектор и дифференциальный рефрактометр.

Ультрафиолетовый детектор

Наибольшее распространение в ВЭЖХ получил абсорбционный детектор, работающий в УФ-области или ультрафиолетовый детектор, который проявляет высокую чувствительность ко многим химическим соединениям, отличается удовлетворительной стабильностью, относительной нечувствительностью к изменению температуры и скорости потока, достаточно широким линейным диапазоном и пригоден для решения различных аналитических задач (предел обнаружения составляет несколько наногرامмов).

Коммерческие УФ-детекторы можно подразделить на 3 вида:

1. С фиксированной длиной волны;
2. С изменяемой длиной волны;
3. С многоканальной регистрацией.

Детекторы первого типа просты по конструкции и недороги. Источниками излучения в них служат ртутные лампы низкого давления, излучающие более 90% света с длиной волны 254 нм. Сочетание лампы и фильтра вырезает более или менее узкую полосу УФ-излучения и определяет фиксированную рабочую длину волны детектора.

К преимуществам детектора с фиксированной длиной волны относится чрезвычайная чувствительность и низкий уровень шума ($1-2 \cdot 10^{-5}$ ед. поглощения), благодаря очень интенсивному излучению ртутной лампы при длине волны 254 нм, надёжность и простота в обращении.

В детекторе второго типа с изменяемой или переменной длиной волны используется источник света с непрерывным спектром излучения и настраиваемый узкополосный фильтр, называемый монохроматором. В детекторах этого типа роль источников излучения выполняют дейтериевые и вольфрамовые лампы. Излучение дейтериевой лампы соответствует диапазону от 190 до 350 нм (с отсечением УФ-излучения до 600 нм с помощью

светофильтра), а излучение вольфрамовой лампы – диапазону 350 -700 нм. В последнее десятилетие указанные детекторы стали более популярными, благодаря их высокой универсальности и возможности детектирования при длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемого соединения, что повышает их чувствительность. Последнее обстоятельство снижает недостаток этого типа детектора, связанный с тем, что уровень шума его примерно в 2,5 раза выше, чем у детектора с фиксированной длиной волны. Поэтому закономерен интерес аналитиков и ученых, проявляемый к жидкостным хроматографам, снабженным детекторами с изменяемой длиной волны.

Существуют быстро сканирующие спектрофотометрические детекторы, которые позволяют снять УФ-спектр вещества при его прохождении через кювету без остановки потока. Один из наиболее удачных детекторов такого типа используют в хроматографе «Милихром», в котором с помощью зеркала, поворачивающегося по заданной программе на определённый угол с установленной частотой, кювета с образцом и сравнительная кювета освещаются последовательно монохроматическими лучами с выбранными различными длинами волн. Получаемая при этом хроматограмма, представляющая собой комбинацию из двух, трёх и более хроматограмм (рис.29), снятых при разных длинах волн, позволяет иметь качественную информацию о возможных примесях, замаскированных в одном пике, о природе и структуре вещества, о длине волны, при которой поглощение данного вещества максимально и можно определить его минимальное количество. Эта информация часто позволяет по одной хроматограмме решить сразу несколько задач: обнаружить примеси, установить чистоту вещества, определить длину волны, при которой поглощение каждого вещества наибольшее, и провести идентификацию. Такие УФ-спектрофотометры позволяют проводить измерения либо в максимуме полосы поглощения, либо при длине волны, обеспечивающей максимальную селективность.

Детектор последнего типа сложен по конструкции. Он работает в сочетании с системой обработки данных, позволяющей строить трехмерные хроматограммы, контурные графики и относительные хроматограммы. Детектор с многоканальной регистрацией позволяет, в соответствии с записанной программой, изменять длину волны для каждого пика или группы пиков таким образом, чтобы получить максимальную чувствительность. Длина волны при этом меняется автоматически несколько раз за время анализа.

Некоторые детекторы регистрируют **спектр поглощения** вещества при остановке потока жидкости, проходящей через измерительную ячейку. Схема кюветы УФ-детектора представлена на рис.26.

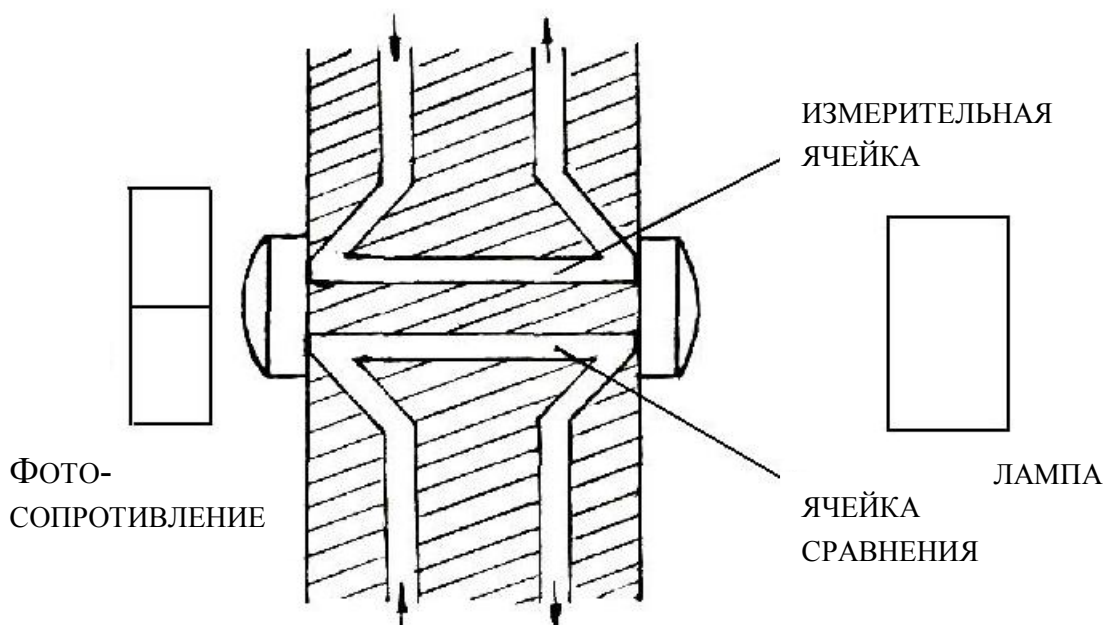


Рис. 26. Кювета УФ-детектора жидкостного хроматографа

Измерительная ячейка заполняется исследуемым раствором. Ячейка сравнения может быть заполнена элюентом или непрерывно промываться им. Объем кювет УФ-детектора – 5-10 мкл.

Полученную информацию обрабатывает компьютер и выдает результаты анализа.

Недостаток УФ-детекторов — специфичность их действия. С помощью этих детекторов можно выявить только такие молекулы веществ, которые поглощают УФ-излучение с длиной волны, близкой к той, на которой работает детектор: ароматические соединения, большинство кетонов и альдегидов и др., полоса поглощения которых достигает этой области длин волн. Чувствительность детектора зависит от величины молярного коэффициента поглощения анализируемого соединения.

Дифференциальный рефрактометр

С помощью дифференциального рефрактометра определяют общий показатель преломления системы проба-элюент. Сигнал получают от всех соединений, показатель преломления которых достаточно отличается от показателя преломления элюента. Поэтому дифференциальный рефрактометр намного более универсален, чем УФ-детектор. Однако показатель преломления зависит от температуры, рефрактометр реагирует на любое изменение состава элюента, следовательно, непригоден для градиентного элюирования. На показаниях дифференциального рефрактометра сказываются также колебания скорости потока.

Условия хроматографирования (состав подвижной фазы, сорбент, скорость подачи элюента, размеры колонки, объем вводимой пробы, тем-

пературный режим) устанавливаются индивидуально для конкретного анализируемого вещества.

Основные хроматографические параметры (время удерживания — t_R ; удерживаемый объём — V_R ; число теоретических тарелок — N (ЧТТ); высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), критерий разделения — r_s характерны и для ВЭЖХ.

Степень разделения веществ в колонке определяется расстоянием между максимумами двух соседних пиков и шириной хроматографической полосы. Расстояние между максимумами зависит от селективности адсорбента по отношению к разделяемым веществам, а ширина полосы — от эффективности колонки, которая определяется характером упаковки частиц адсорбента, вязкостью элюента, размыванием в соединительных узлах и детекторе. Высокоэффективная колонка способна разделять вещества и при малой селективности адсорбента.

В ВЭЖХ широко применяют **коэффициент емкости K'** (вместо коэффициента распределения D в ГЖХ), который не зависит от геометрии колонки:

$$K' = \frac{t_{RA} - t_{Ro}}{t_{Ro}} = K_D \frac{V_{неп}}{V_{под}}$$

где $K_D = C_{Анеп.} / C_{Апод.}$ — коэффициент распределения, отражающий равновесное распределение вещества A ;

$C_{Анеп.}$, $C_{Апод.}$ — общая аналитическая концентрация (или количество) всех форм вещества A в неподвижной и подвижной фазах соответственно;

$V_{неп.}$, $V_{под}$ — объемы неподвижной и подвижной фаз соответственно.

Важным уравнением в жидкостной хроматографии, связывающим основные хроматографические параметры разделения, является следующее:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha_{2,1} - 1}{\alpha_{2,1}} \right) \cdot \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \sqrt{N}$$

где $\alpha_{2,1}$ — (см. с. 28, ГЖХ)

K' , N , R_s — см. выше.

Таким образом, разрешение определяется произведением трех величин, одна из которых зависит от селективности колонки ($\alpha_{2,1}$), вторая — от коэффициента емкости колонки (K') и третья — от эффективности колонки, от ЧТТ (N).

Для практического разделения достаточно, чтобы исследуемое вещество удерживалось в колонке в 2-10 раз сильнее, чем несорбируемое вещество.

Число теоретических тарелок в ВЭЖХ может достигать 10^6 , что приводит к высокой эффективности колонок.

2.1.4. Качественный и количественный анализы

Идентификацию веществ методом ВЭЖХ проводят по хроматограмме с учётом параметров удерживания компонентов (ранее рассмотрена в разделе “Газожидкостная хроматография”) или по УФ-спектрам компонентов.

Например, идентификацию парацетамола в суппозиториях ректальных можно проводить следующим образом:

А. При остановке движения элюата снимают УФ-спектр анализируемого образца и сравнивают его со спектром стандартного образца. Совпадение полос поглощения спектров свидетельствует об идентичности анализируемых веществ (рис. 27).

Б. При прохождении анализируемого и стандартного растворов через кюветы УФ-детектора получают их хроматограммы. При совпадении времен удерживания делают вывод об идентичности веществ, входящих в анализируемые растворы (рис. 28).

В. Идентификацию веществ проводят, используя **многоволновую (многоканальную)** хроматографию по коэффициенту, рассчитанному из показателей абсорбции, измеренных при разных длинах волн (если позволяет детектор).

На рис.29 представлена многоволновая хроматограмма анализируемого раствора эналаприла малеата (таблетки 0,01 г).

На рис.30 представлена хроматограмма, полученная при анализе цитрамона, имеющего в своем составе парацетамол, кофеин, ацетилсалициловую кислоту. На хроматограмме изображены пики всех указанных ингредиентов и времена их удерживания, соответствующие стандартным образцам.

Количественное содержание индивидуальных веществ или каждого компонента в смеси проводят (см. раздел Количественный анализ, ГЖХ):

- путем сравнения площадей пиков анализируемого и стандартного веществ, полученных в одинаковых условиях;
- методом внутреннего стандарта;
- используя градуировочный график.

В Приложении 2 рассмотрено применение ВЭЖХ для испытаний на подлинность, растворение, количественное содержание некоторых лекарственных средств.

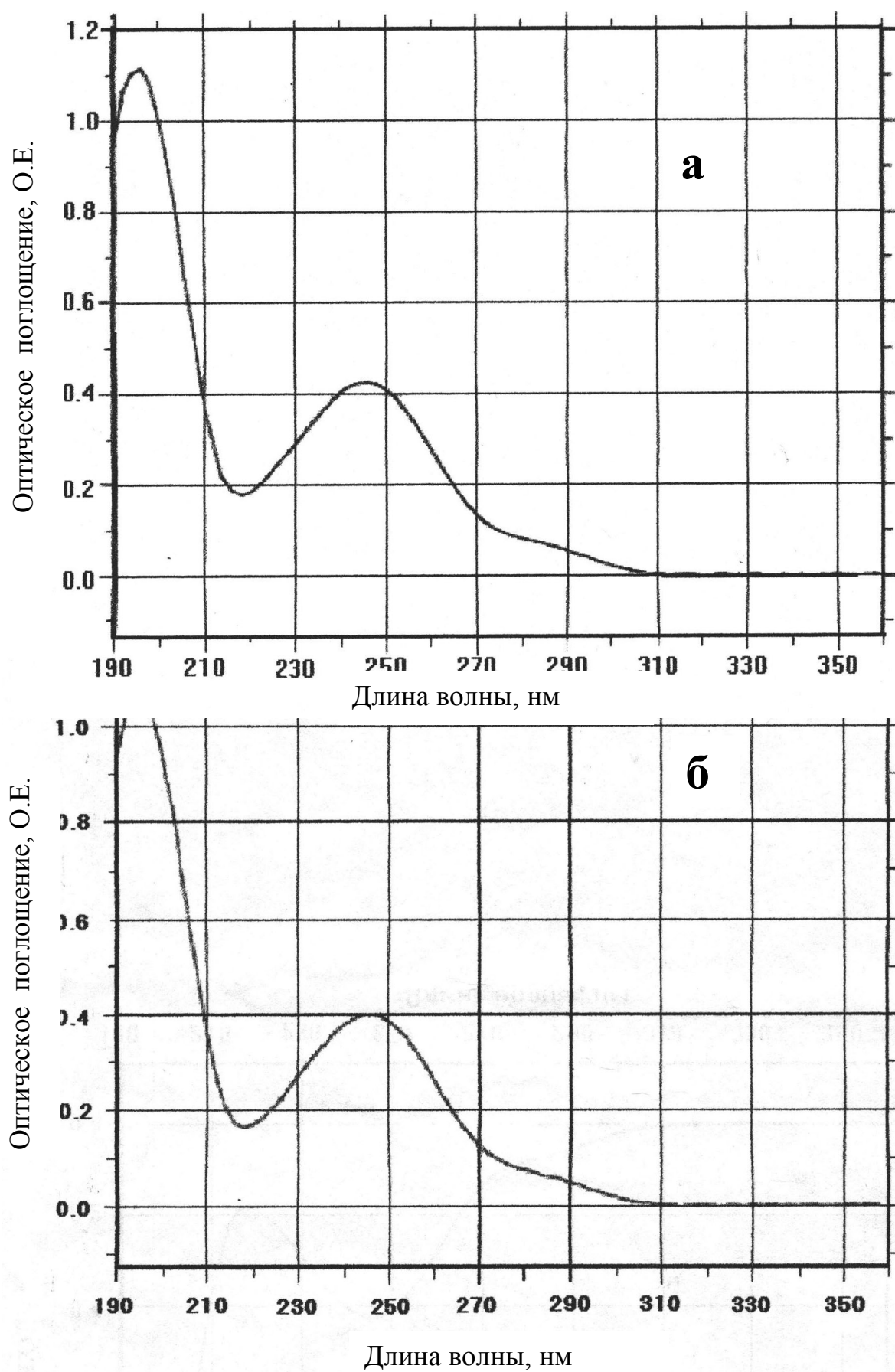


Рис.27. Уф-спектры анализируемого (а) и стандартного (б) растворов (суппозитории ректальные с парацетамолом 0,5 г)

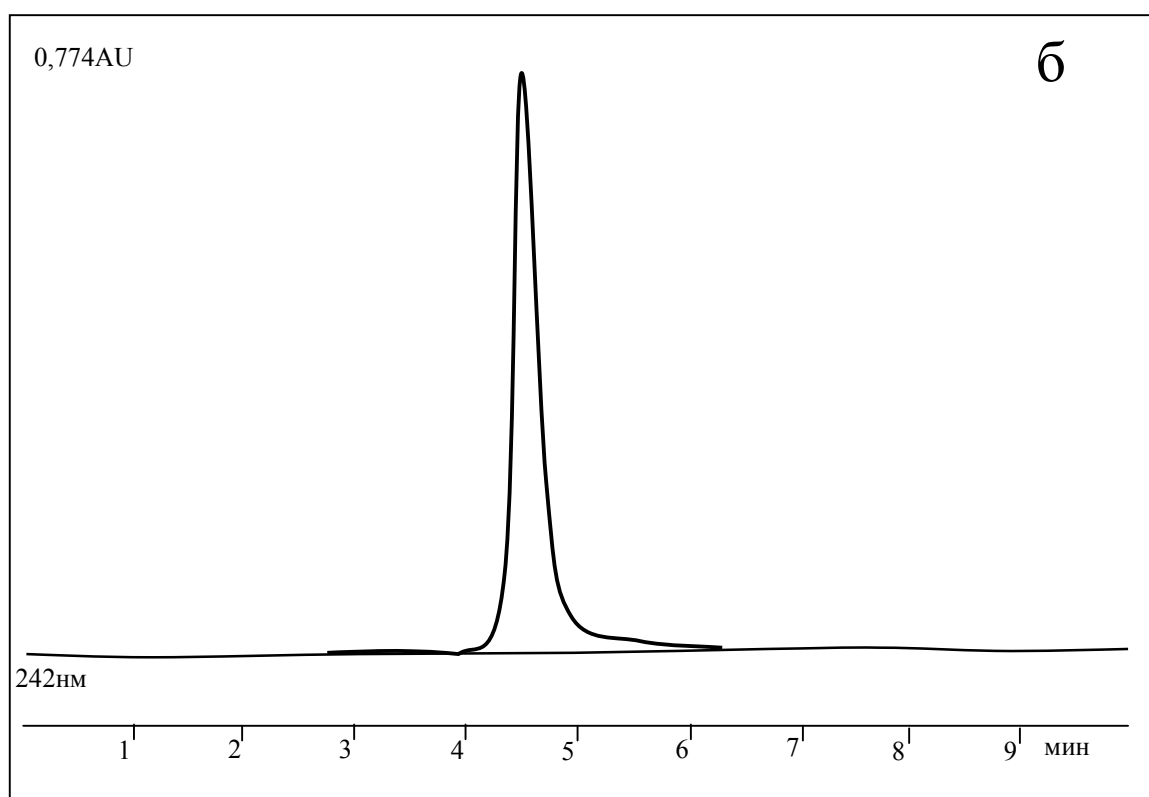
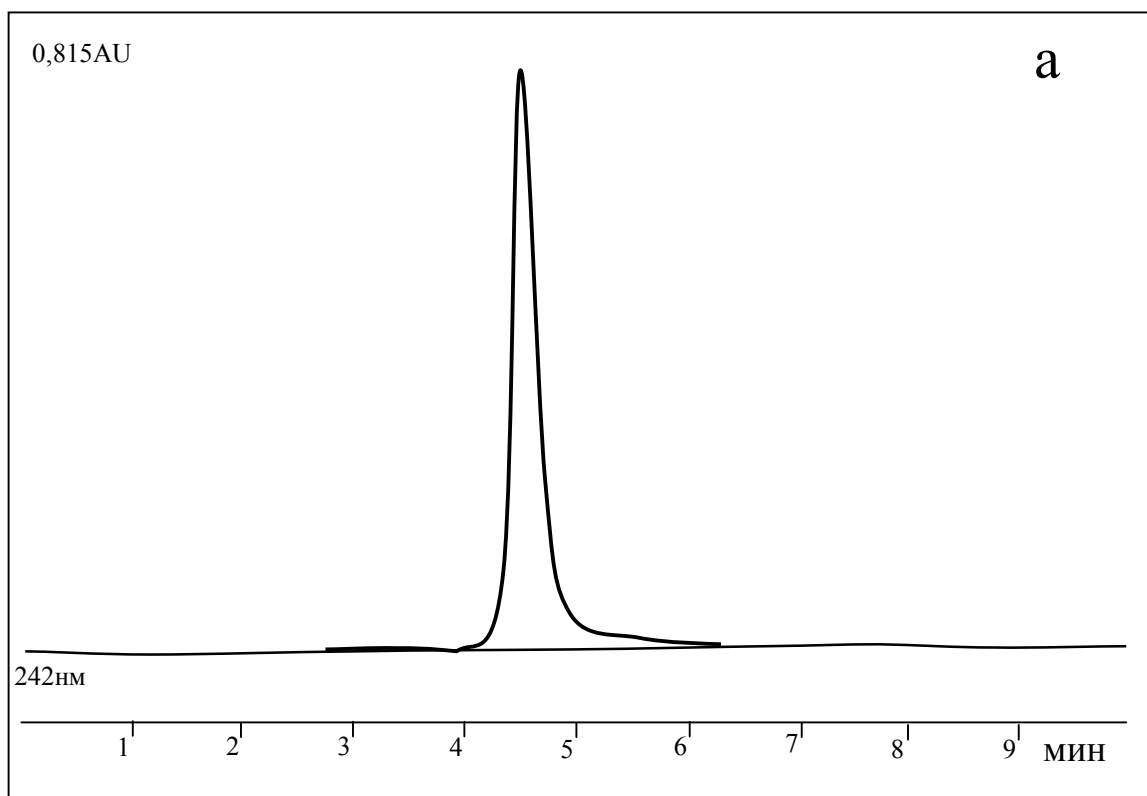


Рис. 28. Хроматограммы анализируемого (А) и стандартного (Б) растворов (суппозитории ректальные с парацетамолом 0,5 г) с УФ-детектированием

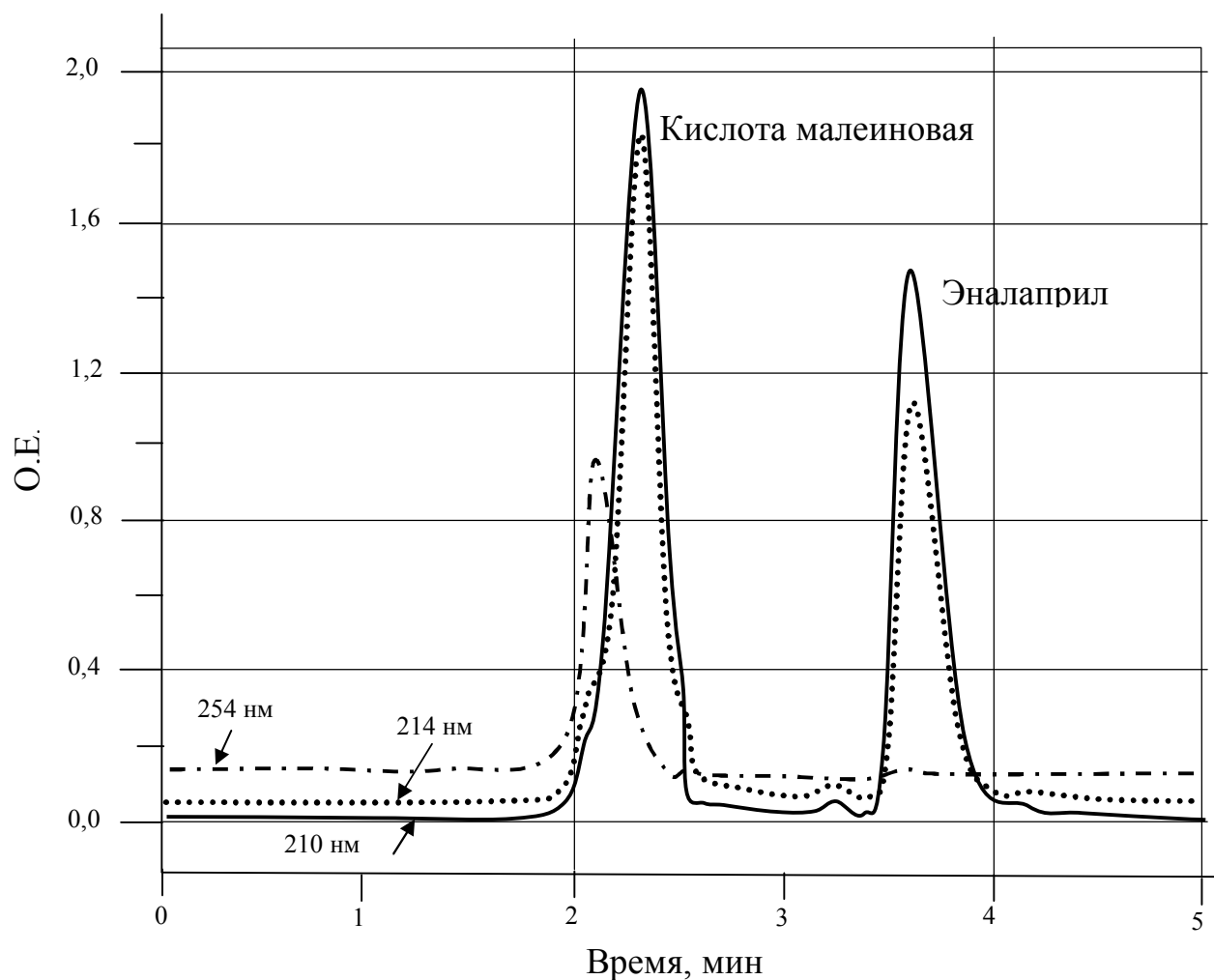


Рис.29. Хроматограмма анализируемого раствора эналаприла малеата (таблетки 0,01 г) с УФ-детектированием

- путем сравнения площадей пиков анализируемого и стандартного веществ, полученных в одинаковых условиях;
- методом внутреннего стандарта;
- используя градуировочный график.

В Приложении 2 рассмотрено применение ВЭЖХ для испытаний на подлинность, растворение, количественное содержание некоторых лекарственных средств.

2.1.5. Современные жидкостные хроматографы

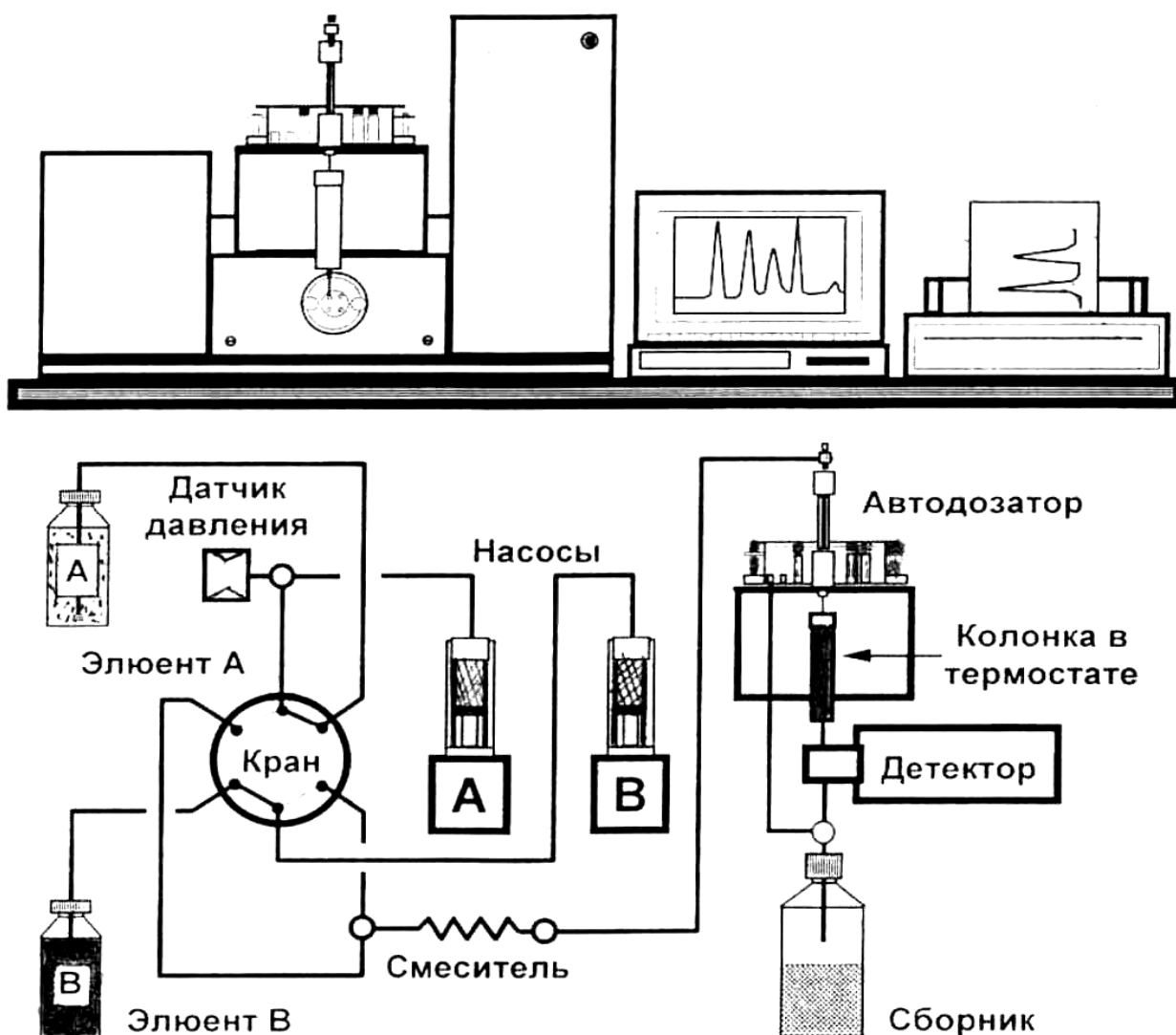


Рис. 31. Внешний вид и схема хроматографа «Милихром А-02»

Современные жидкостные хроматографы снабжены микропроцессором и устройствами, с помощью которых можно автоматически производить ввод пробы, поддерживать условия хроматографического процесса по заданной программе, автоматически оптимизировать условия разделения, проводить идентификацию и расчет количественного состава анализируемой смеси по одной или нескольким программам.

В настоящее время для анализов методом ВЭЖХ используют хроматографы серии «Милихром», фирмы «Hewlett Packard» и др.

Ниже представлены внешний вид и схема хроматографа «Милихром А-02» (рис.31), внешний вид хроматографа «Милихром 5» (рис.32), внешний вид и характеристики хроматографа «НР 1100» (рис.33).

Высокоэффективный микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» предназначен для работы в стационарных, мобильных или полевых лабораториях, выполняющих анализы качественного состава и количественного содержания веществ для различных отраслей промышленности, медицины, криминалистики, сельского хозяйства, охраны природы, науки.



Рис. 32. Внешний вид хроматографа «Милихром-5»

Комплектация и принцип работы жидкостного хроматографа «НР-1100» (рис. 33).

1. Лоток для растворителей. Растворы из него подаются через дегазатор в колонку. Предусмотрены четыре рабочих склянки, снабженных стеклянными фильтрами Шотта.
2. Вакуум-дегазатор, где растворы освобождаются от растворенных газов, чтобы в колонке не образовались пузыри и застойные зоны, которые искажают форму пиков, а следовательно, и результаты анализа (из-за невозможности адекватно вычислить площадь под кривой).
3. В комплект прибора входят два насоса: градиентный и изократический. Градиентный насос в зависимости от заданных значений подаст две или несколько жидкостей (он имеет четыре канала). Изократический насос смешивает их и подает далее в колонку.
4. Инжектор для ввода проб может быть ручной (шприц), автоматический или автосэмплер. При наличии последнего для исследуемых растворов имеются специальные флакончики вместимостью 2 мл, которые помещаются в лоток: место каждого флакончика пронумеровано от 1 до 100.

Специальное приспособление (держатель или захват) вынимает нужный флакон из гнезда, переносит его в отделение для ввода пробы, игла поднимается, флакон устанавливается на место, игла опускается во флакон, при этом отбирается заданное количество раствора. Держатель воз-

вращает флакон на место, а проба вводится в хроматографическую колонку.



Рис. 33. Внешний вид жидкостного хроматографа «HP 1100» фирмы «Hewlett Packard»

5. **Температура** в данном приборе может задаваться и поддерживаться от 15 до 70⁰С.
6. Введенная проба проходит через колонку; компоненты, если их несколько, разделяются и выходят из нее, а затем регистрируются **детектором**.
7. В данном приборе предусмотрен **УФ-детектор** – спектрофотометр, имеющий проточную кювету и регистрирующий проходящие через нее вещества.
8. Управление прибором осуществляет компьютер, содержащий специальную программу «Chem Station».

В рабочем окне «Chem Station» имеется мнемосхема всего прибора: символическое изображение флаконов с образцами, инжектора, насоса, колонки в термостате, детектора, вычислительной системы и принтера.

Разработанные для исследуемой смеси условия хроматографического разделения заносят в специальные диалоговые окна, предусмотренные программой «Chem Station». При этом формируется метод (Method) и заносится в список методов. В дальнейшем при обращении к этому методу компьютер автоматически устанавливает все заложенные параметры.

Далее следует заполнение информации об образце (Sample info), т.е. название, номер серии, величина навески и т.п., которая хранится в памяти

компьютера и сводит к минимуму (либо вообще устраняет) ведение традиционного лабораторного журнала.

Полученные хроматограммы подвергаются аналитической обработке различными способами. Это могут быть вычисления с использованием градуировочных графиков или хроматограмм стандартных образцов, по которым определяется концентрация исследуемых образцов.

Результат анализа прибор представляет в виде так называемых отчетов (Report), которые по желанию могут содержать либо краткую информацию (Short Report) – хроматограмму и данные о полученных пиках: площади пиков, время удерживания и т.п., либо подробную информацию (Performance Report), включающую критерии разделения соседних пиков, число теоретических тарелок и т.п.

2.1.6. Альтернативный вариант традиционной ВЭЖХ

Высокоэффективная жидкостная хроматография, являясь важнейшим методом фармакопейного анализа субстанций и лекарственных средств, вместе с тем остается одним из самых трудоемких, длительных и дорогостоящих. Так, например, анализ ампициллина по методике, описанной в Европейской фармакопее, занимает свыше 15 часов. Высокая чувствительность ВЭЖХ (как и ГЖХ) к любым изменениям параметров разделения – условиям эксперимента, материалов и аппаратуры – приводит к трудностям воспроизведения описанных методик. До сих пор действует следующий принцип разработки аналитических методик: “каждому веществу своя методика анализа”, при которой устанавливается своя “уникальная” процедура анализа, требующая использования “своей” хроматографической колонки, “своих” подвижных фаз, “своей” методики градуировки хроматографа.

В качестве альтернативы традиционной ВЭЖХ ряд зарубежных токсикологов (S. Baker, M. Bogusz, S. Elliot и др.) и крупный российский специалист по жидкостной хроматографии Г.И. Барам предложили использовать принцип создания унифицированных методик анализа ряда соединений в одной и той же хроматографической системе (колонка с обращенной фазой, градиентное элюирование, УФ-детектирование). Идентификация пиков на хроматограмме исследуемого образца осуществляется путем сравнения их времен удерживания и спектральных характеристик в области УФ-спектра с параметрами, заранее полученными для стандартных веществ. Совокупность указанных параметров представляет собой “базу данных”, а хроматограф, позволяющий осуществлять анализ с применением базы данных, получил название «ВЭЖХ-анализатор».

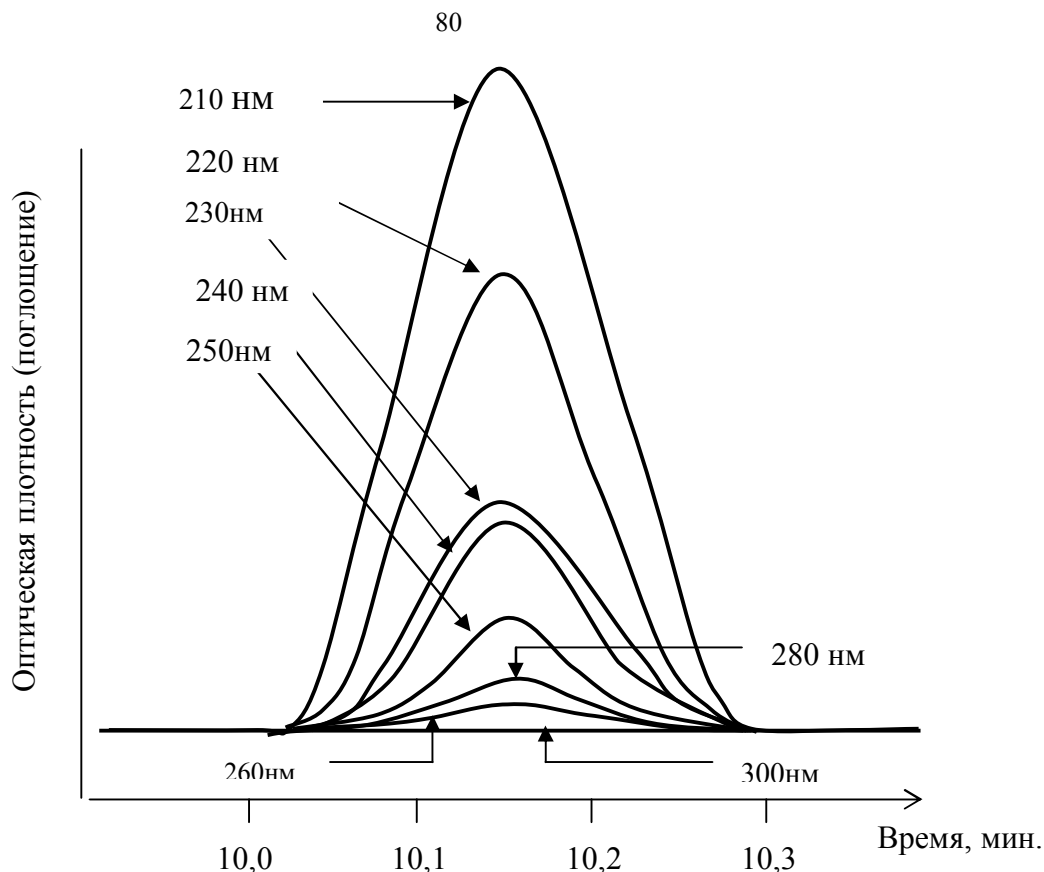


Рис. 34. Хроматограмма кодеина с детектированием при 8 длинах волн

Однако практическому распространению идеи ВЭЖХ-анализаторов препятствуют основные два фактора: 1) описанные анализаторы созданы на базе нестандартных жидкостных хроматографов; 2) проблема стандартизации колонок, при которой только применение одного и того же сорбента (желательно даже из одной партии) гарантирует необходимую воспроизводимость времен удерживания.

В последнее время предложен прототип тиражируемого ВЭЖХ – анализатора на основе градиентного хроматографа «Милихром А-02» со спектрофотометрическим детектором и колонкой с обращенной фазой, который производится по технологии, гарантирующей сохранение его основных технических характеристик от прибора к прибору. Кроме того, данный прибор имеет колонки объемом всего 0,2 мл, что минимизирует расходы сорбента: из 1 кг сорбента одной партии можно сделать 5000 одинаковых колонок и использовать их несколько лет без какой-либо корректировки базы данных. УФ-детектирование осуществляется одновременно при 8 длинах волн (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм) и при этом каждому веществу соответствует 8 пиков с одинаковым временем удерживания, но с разными амплитудами, прямо пропорциональными экстинкции вещества. При совпадении параметров удерживания для компонента смеси и известного вещества осуществляется идентификация компонента, а затем по величинам площадей пиков вычисляют его количественное содержание в образце (рис.34 и 35).

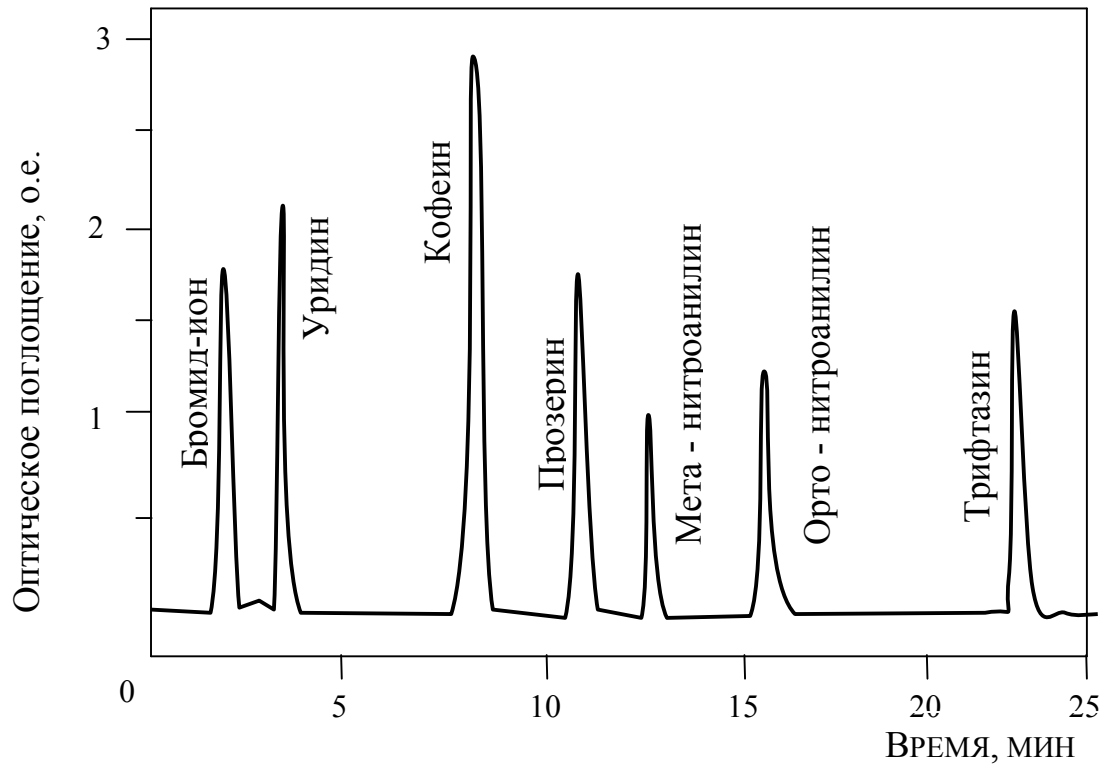


Рис. 35. Пример типичного анализа, выполненного на ВЭЖХ-анализаторе

Вопросы для самоподготовки (ВЭЖХ)

1. Поясните характер процессов, протекающих в хроматографической колонке в методе ВЭЖХ.
2. Укажите особенности ВЭЖХ и ее преимущества.
3. На какие виды делится ВЭЖХ по механизму разделения? Охарактеризуйте их.
4. Поясните варианты жидкостно-адсорбционной хроматографии (нормально-фазовая и обращенно-фазовая).
5. Дайте характеристику микромасштабной ВЭЖХ, укажите классификацию методов микро-ВЭЖХ.
6. Поясните блок-схему современного жидкостного хроматографа и охарактеризуйте работу основных его узлов.
7. Как устроены хроматографические колонки? Укажите их разновидности.
8. Какие вещества используются в качестве сорбента? Укажите их особенности.
9. Какие жидкости используются в качестве подвижной фазы в случаях нормально-фазовой и обращенно-фазовой хроматографии? Укажите требования, предъявляемые к ним.
10. Поясните термины «изократическое элюирование» и «градиентное элюирование».
11. Какие детекторы используются в жидкостном хроматографе?
12. Поясните устройство и работу УФ-детектора.
13. Какими критериями характеризуется хроматографическое разделение в методе ВЭЖХ?
14. Укажите способы идентификации веществ.
15. Поясните способы определения количественного содержания веществ.
16. Укажите марки современных жидкостных хроматографов.
17. Для каких испытаний применяют ВЭЖХ в анализе лекарственных средств?
18. Укажите преимущества ВЭЖХ по сравнению с ГЖХ.

Тест-контроль

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Выберите правильный ответ (один или несколько):

1. В основе метода ВЭЖХ лежит:
 - А. Различие распределения компонентов между двумя фазами при прохождении одной из них в колонке под давлением.
 - Б. Различия адсорбции компонентов смеси на твёрдом сорбенте.
 - В. Различие распределения компонентов смеси между потоком газа-носителя и твёрдым сорбентом в колонке.
2. По механизму разделения анализируемых веществ ВЭЖХ делится на:
 - А. Адсорбционную;
 - Б. Распределительную;
 - В. Ионообменную;
 - Г. Эксклюзионную;
 - Д. Ротационную.
3. Блок-схема современного хроматографа включает:
 - А. Сосуд (сосуды) для подвижной фазы (емкость для элюента);
 - Б. Насос или другой источник давления;
 - В. Устройство для ввода пробы;
 - Г. Испаритель;
 - Д. Хроматографическая колонка;
 - Е. Детектор;
 - Ж. Коллектор фракций.
4. Пробу вводят в поток элюента с помощью:
 - А. Микрошприца;
 - Б. Петли, из которой пробу вымывают в систему элюентом;
 - В. Пипетки;
 - Г. Автоматического дозатора.
5. Насос жидкостного хроматографа
 - А. Подает элюент в колонку при нормальном атмосферном давлении;
 - Б. Подает элюент в колонку при высоких давлениях (200-500 атм.);
 - В. Обеспечивает подачу элюента со скоростью от 0,1 до 10 мл/мин;
 - Г. Осуществляет смену состава элюента.
6. Материалом для изготовления аналитических разделительных колонок служит:
 - А. Стекло;

- Б. Медь;
- В. Нержавеющая сталь;
- Г. Алюминий.

7. В качестве сорбента используют:

- А. Тонкоизмельченный немодифицированный силикагель;
- Б. Тонкоизмельченный химически модифицированный силикагель;
- В. Активированный уголь;
- Г. Оксид алюминия;
- Д. Катионит.

8. В зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз жидкостно-адсорбционная хроматография представлена в вариантах:

- А. Однофазная;
- Б. Многофазная;
- В. Нормально-фазная;
- Г. Обращено-фазная.

9. Укажите факторы, характеризующие хроматографический процесс:

- А. Состав подвижной фазы;
- Б. Сорбент;
- В. Скорость подачи элюента;
- Г. Размеры колонки;
- Д. Температурный режим.

10. По масштабу ВЭЖХ делится на:

- А. Микроколоночную;
- Б. Аналитическую;
- В. Полупромышленную;
- Г. Препаративную;
- Д. Крупнотоннажную;
- Е. Крупномасштабную.

11. Состав элюента может быть на протяжении всей хроматографической процедуры:

- А. Постоянным (изократическое элюирование);
- Б. Различным (градиентное элюирование);
- В. Переменным.

12. К группе специфических детекторов относят:

- А. Спектрофотометрический;
- Б. Электрохимический;
- В. Масс-спектрометрический;
- Г. Флуориметрический;

Д. Рефрактометрический.

13. Работа спектрофотометрического детектора основана на измерении:

- А. Поглощения света;
- Б. Преломления света;
- В. Отражения света.

14. Для ВЭЖХ характерны следующие основные хроматографические параметры:

- А. Время удерживания;
- Б. Число теоретических тарелок;
- В. Высота, эквивалентная теоретической тарелке;
- Г. Критерий разделения;
- Д. Селективность.

15. Идентификацию веществ методом ВЭЖХ проводят:

- А. По времени удерживания;
- Б. По УФ-спектрам;
- В. По площади пика.

16. Количественное содержание индивидуальных веществ проводят:

- А. Путём сравнения площадей пиков анализируемого и стандартного веществ;
- Б. Методом внутреннего стандарта;
- В. Используя градуировочный график;
- Г. Методом внутренней нормализации;
- Д. Методом компьютерной графики.

17. Укажите преимущества ВЭЖХ:

- А. Возможность исследования практически любых объектов;
- Б. "Мягкость" условий ВЭЖХ (температура, близкая к комнатной, отсутствие контакта с воздухом);
- В. Высокая эффективность разделения;
- Г. Высокая чувствительность;
- Д. Экспрессность анализа;
- Е. Дешевизна оборудования.

Ответы к тест-контролю (вэжх)

1. А, Б
2. А, Б, В, Г
3. А, Б, В, Д, Е, Ж
4. А, Б, Г
5. Б, В, Г
6. А, В
7. А, Б, Г, Д
8. В, Г
9. А, Б, В, Г, Д
10. А, Б, Г
11. А, Б
12. А, Г, Д
13. А
14. А, Б, В, Г, Д
15. А, Б
16. А, Б, В, Г
17. А, Б, В, Г, Д

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айвазов Б.В. Основы газовой хроматографии.— М.: Высшая школа.,1974.—183 с.

2. Алексеев Н.А., Вечер Н.С. Метод количественного определения натрия бензоата в отхаркивающем сиропе // Хим.-фарм.журн. — 2002.— Т. 36, № 10.— С.53-54.

3. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, С.А. Волков и др. — М.,1993.

4. Арзамасцев А.П., Никуличев Д.Б., Попов Д.М., Соколов А.В. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных препаратов (обзор) // Хим.-фарм. журн.— 1989.—Т.23, № 4.— С.491-496.

5. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д. и др. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных средств // Фарматека. — 2002.— №11.— С.71-74.

6. Барене И.А., Кастроне В.В., Мишнеева В.Г., Дубурс Г.Я. Изучение стабильности инъекционных растворов фторидона методом ВЭЖХ // Хим.-фарм. журн.— 1997.— Т.31, № 7.— С.54-55.

7. Беликов В.В. Применение ВЭЖХ в анализе флавоноидных препаратов // Пробл. стандартизации и контроля качества лекарств. средств: Материалы докл. Всес.конф — М., 1991.— Т.2, ч.1.— С.14-16.

8. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию/ Под ред. Д.Исии.— М.: Мир, 1991.— 240 с.

9. Вергейчик Т.Х., Онегова Н.С. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе препаратов, содержащих пропифеназон // Фармация.— 2002.— № 6.— С.13-16.

10. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Курс газовой хроматографии. Изд.2-е. — М.: Химия, 1974.— 376 с.

11. Государственная фармакопея СССР.— Вып.1.Общие методы анализа.— 11-е изд.,доп. — М.: Медицина, 1987.— 336 с.

12. Дементьева Н.Н. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтическом анализе // Фармация. — 1979.— № 2.— С.60-68.

13. Евдокимова О.В., Осокин Д.М., Самылина И.А. и др. Применение метода ВЭЖХ в анализе сырья боярышника // Науч.тр. / НИИ фармации МЗ РФ. — 1995. —Т.34.— С.105-109.

14. Зенкевич И.Г. Аналитические параметры компонентов эфирных масел для их хроматографической и хромато-масс-спектрометрической идентификации. Кислородсодержащие производные моно- и сесквитерпеновых углеводородов // Раст. ресурсы. — 1997.— Т.33, вып.1.— С.16-28.

15. Зенкевич И.Г., Багирова В.Л., Сокольская Т.А., Нечаева Е.Б. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек экстрактов и

эликсиров в ведущих странах Европы и Америки // Фармация.— 2002.— № 2.— С.45-48, № 3.— С.45-46.

16. Зенкевич И.Г., Косман В.М., Ткаченко К.Г. Некоторые особенности количественного анализа компонентов эфирных масел в высокоэффективной жидкостной хроматографии // Раст. ресурсы. — 1999.— Т.35, вып.1.— С.128-137.

17. Кальченко О.И., Игнатъев Н.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе тромексана // Хим.-фарм. журн.— 1994.— Т.28, № 5.— С.63-64.

18. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию: Пер. с англ.— М.: Мир, 1993.— 237 с.

19. Козьмин М.А., Михалев А.В., Арзамасцев А.П. Определение компонентов препарата «Бициллин-3» методом ВЭЖХ // Фармация. — 2002.— № 5.— С.5-6.

20. Кондратенко С.Н., Стародубцев А.К., Белякова Г.А. и др. ВЭЖХ определение, фармакокинетика и относительная биодоступность омепразола-акри // Хим.-фарм. журн. — 2002.—Т.36, № 10.— С.49-50.

21. Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии.— М.: Мир, 1976.— 200 с.

22. Краснов Е.А., Дудко В.В., Андреева Т.И., Блинникова А.А. и др. Физико-химические методы исследования.— Томск, 1989.— 110 с.

23. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / Под ред. О.Микеша.— М.: Мир, 1982. — Ч.1.— 400 с.

24. Марек Э.М., Кочетова Н.Ф., Петров А.Ю. Определение бромкамфоры методом ГЖХ // Хим.-фарм. журн. — 1998.— Т.32, № 5.— С.55-56.

25. Методы спутники в газовой хроматографии. — М.: Мир, 1972.— 398 с.

26. Осипов А.С., Архапчев Ю.П., Улогов В.О. Исследование возможности ЖХВД для анализа нового лекарственного средства «Веррукацид» // Хим.-фарм.-журн.— 2003.— № 1.— С.37-40.

27. Основы жидкостной хроматографии / Под ред. А.А.Жуховицкого.— М.: Мир, 1973.— 264 с.

28. Перри С., Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии.— М.: Мир, 1974.— 260 с.

29. Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии.— М.:Мир, 1987.— 260 с.

30. Полетаева Т.И., Краснов Е.А. Скрининговое исследование с применением ВЭЖХ содержания биологически активных веществ растений рода *Rhodiola* // Пробл. стандартизации и контроля качества лекарственных средств —М., 1991. — Т.2, ч.1.— С.27-28.

31. Попов Д.М., Николаев Н.Н., Семенов В.А. Количественное определение целанида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Химия природ. соединений. — 1983.— № 4.— С.476-479.

32. Препаративная жидкостная хроматография: Пер. с англ.— М.: Мир, 1990.— 360 с.

33. Пузаков С.А. Хроматография. — М., 1982.— 51 с.
34. Соколова Т.М., Арзамасцев А.П. Оптимизация условий анализа стероидных гормонов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Фармация. —1989.— Т.38, № 4.— С.24-27.
35. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Руководство к практическим работам по газовой хроматографии.— Л.: Химия, 1988.— 336 с.
36. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография.— М.: Химия, 1986.— 288 с.
37. Тюкавкина Н.А., Колесник Ю.А. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе фитохимических препаратов // Акт. Пробл. соврем. фармации.— М., 1986. — С.110-113.
38. Ульянова С.В., Щавлинский А.Н., Морев С.Н. и др. Анализ водорастворимых витаминов В₁, В₂, В₆ и никотинамида в драже “Тексавит” методом ВЭЖХ // Фармация. — 1993.— Т.42, № 3.— С. 50-51.
39. Хроматография. Практическое приложение метода. В 2-х ч. / Под ред. Э. Хефтмана.— М.: Мир, 1986.— Ч.1.- 336 с., Ч.2.- 422 с.
40. Чепмен Дж. Практическая органическая масс-спектрометрия: Пер. с англ.— М.: Мир, 1988.— 216 с.
41. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. — Рига, 1988.
42. Энгельгардт Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях.— М.: Мир, 1980.— 245 с.
43. Эпштейн Н.А., Демченко Б.И. Определение содержания основного вещества и примесей в таблетках метиландростендиола методом ВЭЖХ // Хим.-фарм. журн. — 1998.— Т.32, № 5.— С.50-52.
44. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа.— М.: Мир, 1989.— 608 с.
45. Юрьев Д.В., Арзамасцев А.П., Эллер К.И. Оценка аутентичности лекарственных препаратов и биологически активных добавок, содержащих эхинацею пурпурную, с помощью жидкостной хроматографии высокого давления // Вопр. биологич., медиц. и фарм. химии. — 2002.— № 4.— С.3-6.
46. Якушина Л.М., Бекетова Н.А., Бендер Е.Д. и др. Использование методов высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения витаминов в биологических жидкостях и пищевых продуктах // Вопр. питания.— 1993. — № 1.— С. 43-48.
47. Ali A. J. Residue analysis of organophosphorus pesticides in crops by gas chromatography with different detection // Anal. Lab.— 1993.— V.2, № 3.— P. 210-213.
48. Dallenbah-Folke K., Nyiredy S., Meier B., Stecher O. HPLC-analyse der flavonoidglykoside aus Betula folium // Planta med.— 1987.— Bd.53, № 2.— S.189-192.

49. Davies N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20 M phases // *J. Chromatogr.A.* — 1990.— V.503.— P.1-24.

50. Glasi S., Kastner U., Jurerutsch J., Kubelka W. Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography // *J. Chromatogr.B.*— 1999.— V.729, № 1-2.— P.361-368.

51. Haakinen S.H., Karenlampi S.O., Heinonen I.M. et al. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries // *J. Sci. Food Agric.*— 1998. — V.77.— P.543-551.

52. Keder-Hackmann E.R.M., Ntry M.M.F., Ines M., Santoro R.M. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparation by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography // *Anal. Lett.* — 1994.— V.27, № 2.— P.363-376.

53. Kirshbaum J., Norosri J., Cosey A. et al. High-performance liquid chromatography of the drug fosenopril // *J. Chromatogr.* — 1990.— V.16, № 507.—P.165-170.

54. Okuyama T., Takata M., Takahashi K. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of naturally occurring glycosides and saponins // *J. Chromatogr.* — 1989.— V.466.— P.390-399.

55. Pryce-Jones R.H., Marshall D.E. HPLC with electrochemical detection as a quality control method for some phenolic and related pharmaceuticals // *J. Pharmac. Pharmacol.*— 1988.— V.40.— P.84.

56. Ryan D., Antolovich M., Herlt T. et al. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardys Mammoth // *J. Agric. Food Chem.*— 2002.— V.50, № 23.— P.6716-6724.

57. Shan Y., Joshi S., Jindal K.C., Khanna S. Stability indicating HPLC method for ribavirin and its pharmaceutical dosage forms // *Drug Dev. Ind. Pharm.*— 1994.— V.20, № 1.— P.85-91.

58. Singhai A.K., Shakya A., Talwar N. et al. Simultaneous determination of oxyphenbutazone, paracetamol and diazepam in unit dosage form by HPLC: Abstr. 42nd Ind. Pharm. Cong. // *Indian J. Pharm. Sci.* — 1991.— V.53, № 3.— P. 143.

59. The United States Pharmacopeia USP 26. —2003.— P.2130-2133.

60. Wagner H., Tittel G., Bladt S. Analyse und Standartisierung von Arzneidrogen und Phytopreparaten durch Hochleistungsflussigchromatographie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren. I. Mitteilung: Flavonoid-drogen // *Dtsch. Apoth. Ztg.* — 1983.— Bd.123, № 11.— S.515-521.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ
ДЕПАРТАМЕНТА ГОСУДАРСТВЕННОГО
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА, ЭФФЕКТИВНОСТИ,
БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
И МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Д.В.РЕЙХАРТ

“ 13 “ ДЕКАБРЯ 2001 г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Остаточные органические
растворители**

ОФС 42-0004-01
Вводится в первые

Остаточные органические растворители — это растворители, которые используются на любой стадии производства лекарственного средства и полностью не удаляются после завершения технологического процесса.

Контролю на содержание органических растворителей подвергаются лекарственные и вспомогательные вещества, а также лекарственные формы независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители или они могут образоваться в процессе производства.

Нормативные документы (НД): ФС, ФСП, регламентирующие качество таких лекарственных и вспомогательных веществ, а также готовых лекарственных форм, должны иметь раздел "Остаточные органические растворители". Отсутствие такого раздела в НД должно быть обосновано.

Предельно допустимое содержание органических растворителей в лекарственных средствах определяется степенью их возможного риска для здоровья человека и окружающей среды. Эти факторы положены в основу классификации органических растворителей:

1-й класс — высокотоксичные растворители (генотоксичные канцерогены), применяемые в фармацевтическом производстве в исключительных случаях, когда нельзя избежать их использования (табл.1);

2-й класс — негенотоксичные растворители. Нормирование их в лекарственных средствах обусловлено максимально допустимым количеством, принимаемым в составе суточной дозы лекарственного средства (табл.2);

3-й класс — растворители низкой токсичности, содержание которых до 0,5% не требует подтверждения (табл.3). Содержание таких растворителей допускается и в более высоких пределах, если это регламентировано правилами надлежащей производственной практики или иными стандартами производства.

Определение остаточных органических растворителей может быть осуществлено любыми валидными методами. Наиболее часто для этих целей используется метод газожидкостной хроматографии.

Для определения растворителей 3-го класса допускается применение неспецифического метода, такого как "Потеря в массе при высушивании".

Содержание остаточных органических растворителей в лекарственных средствах может быть представлено в следующих вариантах:

- 1) при наличии растворителей 3-го класса токсичности их уровень выражается величиной потери в массе при высушивании. Например, потеря в массе при высушивании менее 0,5%;
- 2) при наличии растворителей 2-го класса указывается наименование каждого из них и отмечается, что его содержание ниже предела в единицах ppm (часть на миллион);
- 3) при наличии растворителей 2-го и 3-го классов указывается, что содержание каждого растворителя 2-го класса ниже предела в единицах ppm, а содержание растворителей 3-го класса — менее 0,5%. Если содержание растворителей 2-го и 3-го классов превышает 0,5%, каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно;
- 4) при наличии растворителей 1-го класса каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно.

Типовая методика определения некоторых органических растворителей приведена в Приложении. Указание на необходимость определения в лекарственном веществе или готовом лекарственном средстве иных органических растворителей, не представленных в данной методике, должно содержаться в соответствующем НД.

Т а б л и ц а 1

Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 1-го класса токсичности

Растворитель	Предельное содержание, ppm
Бензол	2
Четыреххлористый углерод	4
1,2-Дихлорэтан	5
1,1-Дихлорэтан	8
1,1,1-Трихлорэтан	1500

Т а б л и ц а 2

Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 2-го класса токсичности

Растворитель	Предельное содержание, ppm
Ацетонитрил	410
Хлорбензол	360
Хлороформ	60
Циклогексан	3880
1,2-Дихлорэтен	1870
Дихлорметан	600
N, N-Диметилацетамид	100
N, N-Диметилформамид	880
1,4-Диоксан	380
2-Этоксизэтанол	160
Этиленгликоль	620
Формамид	220
Гексан	290
Метанол	3000
2-Метоксиэтанол	50
Метилбутилкетон	50
Метилциклогексан	1180
N-метилпирролидон	4840
Нитрометан	50
Пиридин	200
Сульфолан	160
Тетралин	100
Толуол	890
1,1,2-Трихлорэтен	80
Ксилол	2170

Т а б л и ц а 3

Растворители 3-го класса токсичности, которые подлежат нормированию правилами надлежащей производственной практики или другими стандартами производства

Уксусная кислота	Гептан
Ацетон	Изобутилацетат
Анизол	Изопропилацетат
1-Бутанол	Метилацетат
2-Бутанол	3-Метил-1-бутанол
Бутилацетат	Метилэтилкетон
<i>трет</i> -Бутилметилловый эфир	Метилизобутилкетон
Кумол	2-Метил-1-пропанол

Диметилсульфоксид	Пентан
Этанол	1-Пентанол
Этилацетат	1-Пропанол
Этиловый эфир	2-Пропанол
Этилформиат	Пропилацетат
Муравьиная кислота	Тетрагидрофуран

Условия проведения анализа на остаточные растворители описаны в соответствующих НД. Ниже приводится типовая методика определения органических растворителей в лекарственных средствах.

Приложение

Типовая методика определения остаточных органических растворителей с использованием метода газожидкостной хроматографии

Методика предназначена для:

- идентификации большинства органических растворителей 1-го и 2-го классов в лекарственных и вспомогательных веществах, готовых лекарственных формах в тех случаях, когда эти растворители не известны;
- установления пределов содержания растворителей 1-го и 2-го классов в лекарственных средствах;
- количественного определения растворителей 2-го класса при их содержании более 1000 ppm (0,1%);
- количественного определения растворителей 3-го класса, если есть соответствующее указание в НД на лекарственное или вспомогательное вещество, а также на готовое лекарственное средство.

Требования к прибору

Газовый хроматограф с программированием температуры, снабженный:

- инжектором со стеклянной вставкой, препятствующей контакту пробы с металлическими поверхностями, который обеспечивает работу в режимах "с расщеплением потока" и "без расщепления потока";
- детектором ионизации пламени;
- капиллярной колонкой из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25; 0,32; 0,53 мм, покрытой неподвижной фазой, содержащей 5% полицианопропилфенилсилоксана и 95% полидиметилсилоксана (например, CP Sil 8 CB Chrompack, Rtx – 5 Restek, DB – 5 J&W Scientific);
- газом-носителем: гелий, водород, азот.

Калибровка прибора

Для подтверждения линейной зависимости отклика детектора от концентрации и вычисления фактора отклика детектора для каждого определяемого растворителя используется метод абсолютной градуировки (ГФ XI. Вып.1.с. 109) с помощью рабочих стандартных образцов А, Б, В.

Процедура калибровки предусматривает трехкратное введение в хроматограф рабочих стандартных образцов (РСО) А, Б, В и получение хроматограмм в следующих условиях:

- температура инжектора - 200⁰С;
- температура детектора - 250⁰С;
- температура колонки программируется от 35⁰С (задержка 3 минуты) до 180⁰С со скоростью 8⁰С/мин (задержка 9 минут);
- линейная скорость потока газа-носителя составляет 1 мл/мин — для колонок с внутренним диаметром 0,25 и 0,32 мм; 2,5 мл/мин — для колонок с внутренним диаметром 0,53 мм.

Приготовление испытуемой пробы

Если нет других указаний в НД, подготовка пробы, подлежащей исследованию на содержание остаточных органических растворителей, осуществляется одним из следующих методов:

Метод 1 (для определения растворителей в веществах, хорошо или ограниченно растворимых в воде): около 0,5 г испытуемого образца (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл воды для инъекций, растворяют при постоянном перемешивании в течение 20 минут, осторожно доводят до метки этим же растворителем. Затем фильтруют через бумажный или стеклянный фильтр с размером пор 0,45 мкм. 1 мкл полученного раствора вводится в инжектор хроматографа.

Метод 2 (для определения летучих и полуметучих растворителей): около 1,0 г испытуемого образца (точная навеска) помещают в стеклянный флакон вместимостью 10 мл. Флакон герметически укупоривают металлической крышкой с прокладкой из силиконовой резины и термостатируют вместе с микрошприцем на 100 мкл в течение 40 минут при температуре 70⁰С. По истечении времени термостатирования горячим шприцем (Осторожно! Горячая поверхность. Брать руками в перчатках) прокалывают прокладку флакона, отбирают 100 мкл равновесной воздушно-паровой фазы над навеской и быстро вводят в инжектор, хроматографа. Для ввода воздушно-паровой фазы, наряду с микрошприцем, допускается применение автоматического дозатора с объемом петлевого ввода 100 мкл. При этом температура масляной бани устанавливается на уровне 70⁰С, температура петли и переходных линий — 90⁰С и 110⁰С соответственно.

Метод 3 (для определения органических растворителей в количествах менее 0,001%): предусматривает концентрирование анализов из воздушно-паровой фазы на специальную кварцевую нить с развитой поверхностью, покрытой слоем диметилполисилоксана толщиной 100 мкл, с последующей термической десорбцией их в инжекторе хроматографа. Для получения воспроизводимых результатов необходимо использовать автоматическое устройство для ввода проб — автосамплер со специальным шприцем для автоматической твердофазной микроэкстракции и нагреваемым держателем образца.

Около 1,0 г испытуемого образца (точная навеска) помещают в стеклянный флакон вместимостью 10 мл, герметически укупоривают металлической крышкой с прокладкой из силиконовой резины и термостатируют в держателе образца в течение 5 минут при температуре 70°C. Автосамплером кварцевую нить вводят через прокладку в воздушно-паровую фазу над испытуемым образцом и выдерживают в течение 15 минут для сорбции аналитов. Затем нить извлекают из флакона, вводят в инжектор хроматографа и выдерживают 4 минуты для их десорбции.

Приготовление раствора РСО

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 мл охлажденной до 10°C воды и по 0,2 г (точная навеска) каждого из нижеперечисленных растворителей: ацетон, ацетонитрил, спирт метиловый, спирт этиловый, бензол, гексан, 1,2-дихлорэтан, дихлорметан, хлороформ, этилацетат, толуол, диэтиловый эфир, 1,4-диоксан. Содержимое колбы тщательно перемешивают и доводят объем до метки водой при постоянном помешивании (раствор А). Отбирают 50 мл раствора А, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки при постоянном помешивании водой (раствор Б). 50 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой (раствор В),

Примечание. Раствор РСО должен быть использован в течение 30 минут после его приготовления.

Методика

Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по двум рядом стоящим пикам, составляет не менее 1000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площадей пиков хлороформа, бензола, дихлорметана или 1,4-диоксана, не превышает 15%;
- коэффициенты разделения R_s , рассчитанные для пиков хлороформа, бензола, дихлорметана или 1,4-диоксана, с пиками ближайших соседей должны быть не менее 3.

Идентификация растворителей осуществляется путем сравнения времен удерживания пиков анализируемой пробы и РСО (см. общую статью ГФ XI "Газовая хроматография".)

Количественное определение. Количественное определение проводится методом сравнения со стандартным образцом, как правило, в варианте абсолютной калибровки для каждого исследуемого органического растворителя.

1 мкл фильтрата пробы (метод 1), или 100 мкл воздушно-паровой фазы (метод 2), или кварцевую нить с сорбированными аналитами (метод 3) вводят в хроматограф, получая не менее 5 хроматограмм в указанных выше условиях.

Типичная хроматограмма представлена на рисунке 1. Количественное содержание каждого растворителя в % (по массе) вычисляют по

$$Q = \frac{S_i \times 100}{A} \times K$$

где Q — количество определяемого растворителя;

S_i — площадь его пика на хроматограмме;

A — среднее значение отношения площади пика стандарта к количеству стандарта;

K — фактор отклика детектора (отношение площади пика стандарта к площади пика РСО, хроматографируемых в одинаковых условиях).

Примечание: допускается применение компьютерной обработки результатов при условии, что программа количественной обработки хроматограмм базируется на стандартном алгоритме, например, Мультихром (Амперсенд, Россия), Star Workstation (Varian, USA), ChimStation (Agilent Technology, USA), TurboChrom (Perkin Elmer) или аналогичные.

Через каждые 10 определений рекомендуется проводить валидацию метода.

Председатель Фармакопейного
Государственного комитета
академик РАМН

А.П.Арзамасцев

Главный ученый секретарь
Фармакопейного Государственного
комитета

В.Л.Багирова

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ
 Руководитель Департамента
 Государственного контроля качества,
 эффективности, безопасности
 лекарственных средств и медицинской
 техники Минздрава России

_____ Р.У.Хабриев

«_____» _____ г.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Spiritus aethylicus 95%

ФС 42-3072-00

Спирт этиловый 95%
D(-)-трео-1-(4-Нитрофенил)-2-
(дихлорацетамидо)-1,3-пропандиол

Взамен ФС 42-3072-94

Срок введения установлен
 с «22» 06 2000 г.
 Срок действия
 до «22» 06 2005 г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на спирт этиловый 95%, применяемый в медицинских целях.

Описание. Прозрачная, бесцветная, подвижная, летучая жидкость с характерным спиртовым запахом и жгучим вкусом. Кипит при 78°C. Легко воспламеняется, горит синеватым, слабо светящимся бездымным пламенем.

Растворимость. Смешивается во всех соотношениях с водой, эфиром, хлороформом, ацетоном и глицерином (ГФ XI, вып.1, с. 176).

Подлинность. 2 мл препарата смешивают с 0,5 мл кислоты уксусной ледяной и 1 мл кислоты серной концентрированной и нагревают до кипения; обнаруживается характерный запах этилацетата.

0,5 мл препарата смешивают с 5 мл раствора натра едкого, прибавляют 2 мл 0,1 М раствора йода; появляется запах йодоформа и постепенно образуется желтый осадок.

Плотность. От 0,812 до 0,808, что соответствует содержанию C_2H_5OH от 95 до 96 % (ГФ XI, вып.1, с. 24).

Прозрачность. Смесь равных объемов препарата и воды должна быть прозрачной (ГФ XI.Вып.1.с.198).

Кислотность или щелочность. К 20 мл препарата прибавляют 25 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды и 0,1 мл раствора фенолфталеина. Раствор остается бесцветным и окрашивается в розовый цвет, устойчивый в течение 30 с от прибавления не более 0,2 мл 0,05 М раствора натра едкого.

Хлориды, сульфаты, тяжелые металлы. 6 мл препарата разбавляют водой до объема 30 мл. 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на хлориды, сульфаты и тяжелые металлы (ГФ XI.Вып.1.с.165).

Альдегиды. 20 мл 40 % (по объему) водноспиртового раствора вносят в пробирку с пришлифованной пробкой, прибавляют 1 мл 2 % раствора кислоты уксусной, плотно закрывают пробкой и перемешивают. Прибавляют 2 мл раствора кислоты фуксинсернистой, вновь плотно закрывают пробкой и помещают пробирку в водяную баню с температурой 20°C на 30 мин. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре в кювете с толщиной слоя 50 мм при длине волны 536 нм относительно воды. Величина оптической плотности не должна превышать 0,250.

Примечание.1. Приготовление раствора кислоты фуксинсернистой. 0,22 г (точная навеска) основного фуксина (для кислоты фуксинсернистой по ТУ 6-09-4091-75) растирают в фарфоровой ступке с 1,5 мл воды до образования однородной массы. Затем прибавляют 25 мл воды с температурой 95-98°C и смесь без потерь переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл. Ступку и пестик обмывают горячей водой. Общий объем в колбе не должен превышать 120-150 мл. Колбу с содержимым помещают в водяную баню с температурой 90-95°C и энергично перемешивают. Затем раствор охлаждают, доводят объем раствора водой до метки и тщательно перемешивают до полного растворения фуксина. Полученный раствор переносят в бутылку из темного стекла с пришлифованной пробкой вместимостью 500 мл, смешивают с 20 мл раствора натрия пироксернистокислого (относительная плотность 1,290) и 3 мл кислоты серной концентрированной. Полученный раствор используют по истечении 12 ч после его приготовления.

Срок годности 2 мес при хранении в холодильнике.

2. Приготовление раствора натрия пироксернистокислого.

20 г натрия пироксернистокислого помещают в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 100 мл и прибавляют 20 мл воды. Колбу закрывают пробкой и настаивают содержимое в течение 5-6 ч. Насыщенный раствор фильтруют через бумажный складчатый фильтр на воронке, прикрытой часовым стеклом. Фильтрат собирают в цилиндр вместимостью 50 мл и доводят его относительную плотность до 1,290.

Раствор используют свежеприготовленным.

3. Приготовление 2 % раствора кислоты уксусной. В мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 100 мл помещают 2 мл кислоты уксусной ледяной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Концентрацию полученного раствора определяют следующим образом. В коническую колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл полученного раствора кислоты уксусной, прибавляют 30-50 мл воды и определяют концентрацию этого раствора путем титрования 0,1 М раствором натра едкого в присутствии фенолфталеина. На титрование 10 мл раствора с массовой долей кислоты уксусной 2 % должно пойти 33,3 мл 0,1 М раствора натра едкого. Если этого раствора на титрование пойдет меньше или больше, то к раствору кислоты уксусной соответственно прибавляют по каплям кислоту уксусную концентрированную или воду.

Срок годности раствора 2 мес.

4. Приготовление 40 % вводно-спиртового раствора (по объему). Объем исходного спирта, который необходимо смешать с водой, чтобы получить необходимый объем вводно-спиртового раствора, вычисляют по формуле:

$$V_1 = \frac{V_2 \cdot 40}{C_1},$$

где V_1 — объем исходного спирта, в миллилитрах; V_2 — объем 40% вводно-спиртового раствора, который необходимо приготовить, в миллилитрах; 40 — концентрация водно-спиртового раствора, в процентах; C_1 — концентрация спирта, в процентах. Концентрацию полученного вводно-спиртового раствора измеряют в цилиндре вместимостью 500 мл при температуре 20°C.

Спирт метиловый и другие летучие примеси. Определение проводят методом ГЖХ.

Условия хроматографирования:

Оборудование: газовый хроматограф с пламенно ионизационным детектором.

Колонка: стеклянная капиллярная колонка (25 м x 0,2 мм), сорбент Carbowax 20 M (0,2 мкм).

Газ носитель: гелий.

Температура колонки: 50 °С.

Температура детектора: 110 °С.

Температура испарителя 110 °С.

В испаритель хроматографа вводят 1 мкл препарата, содержащего 0,005 % альдегида уксусного (внутренний стандарт). Записывают хроматограмму в течение 10 мин после выхода пика внутреннего стандарта.

Площадь пика с временем удерживания относительно внутреннего стандарта 1,6 (спирт метиловый) не должна превышать площадь пика внутреннего стандарта более, чем в три раза (не более 0,02 %).

Сумма площадей остальных пиков примесей не должна превышать площадь пика внутреннего стандарта (не более 0,005 %).

Примечание. Приготовление раствора внутреннего стандарта. Около 0,05 г (точная навеска) альдегида уксусного (ГОСТ 9585-77) перегнанного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл препарата, встряхивают до растворения, доводят объем раствора препаратом до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора препаратом до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 7 сут.

Восстанавливающие вещества. Цилиндр с притертой пробкой ополаскивают испытуемым спиртом, вносят 50 мл этого спирта и погружают на 10 мин в воду с температурой 15°С таким образом, чтобы вода находилась выше уровня спирта в цилиндре. По истечении 10 мин в цилиндр прибавляют 1 мл 0,02 % раствора калия перманганата, закрывают цилиндр пробкой и, перемешав жидкость, вновь погружают в воду с температурой 15°С. При стоянии красно-фиолетовая окраска смеси постепенно изменяется и должна достигнуть окраски эталона не ранее, чем через 20 мин.

Примечание. 1. Приготовление эталона. 5 мл раствора кобальта хлорида смешивают в мерной колбе вместимостью 100 мл с 7 мл раствора калия бихромата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 5 сут.

2. Приготовление раствора кобальта хлорида. 50 г кобальта хлорида растворяют в воде, прибавляют 2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и разбавляют водой до 1 л.

Срок годности раствора 1 сут.

3. Приготовление 0,02 % раствора калия перманганата. 0,02 г калия перманганата растворяют в 100 мл воды.

Срок годности раствора 1 сут.

4. Приготовление раствора калия бихромата. 0,100 г растертого калия бихромата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 500 мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора 6 мес.

Сивушные масла. Полоску фильтровальной бумаги смачивают смесью, состоящей из 10 мл препарата, 5 мл воды и 1 мл глицерина. После испарения жидкости не должен ощущаться посторонний запах.

Сивушные масла и другие органические вещества. 10 мл препарата помещают в колбу вместимостью 25 мл, тщательно ополоснутую испытуемым спиртом, прибавляют при постоянном взбалтывании в несколько приемов 9 мл кислоты серной концентрированной. Смесью нагревают до образования пузырьков пены и дают остыть. Смесью должна оставаться бесцветной.

Дубильные и другие экстрактивные вещества. К 4 мл препарата прибавляют 0,8 мл раствора аммиака; не должна появляться окраска.

Нелетучие вещества. 10 мл препарата выпаривают досуха на водяной бане и сушат при температуре 100-105°C, до постоянной массы; остаток не должен превышать 0,01 %.

Фурфурол. В градуированный цилиндр с притертой пробкой помещают 2 мл свежеперегнанного анилина, 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и прибавляют испытуемый спирт до объема 10 мл; в течение 10 мин смесь должна оставаться бесцветной.

Упаковка. По 50, 100 мл в банки или флаконы из стекломассы с винтовой горловиной типа БВ или ФВ по ОСТ 64-2-71-80 или по ТУ 21-074.1-184-99 или импортные, укупоренные пробками типа 3.1. или импортными и навинчиваемыми крышками типа 1.1. или импортными или в стеклянную тару по ГОСТ 10117-91 или импортную, укупоренную колпачками алюминиевыми из алюминиевой фольги или импортными.

По 10,0, 21,5 и 31,5 л в канистры полиэтиленовые по ТУ 297-001-50161205-99.

На каждую единицу потребительской тары наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или писчей по ГОСТ 18510-87 или самоклеющуюся этикетку.

Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. На этикетке потребительской упаковки указывают предприятие-изготовитель и его товарный знак, название препарата на русском языке, объем в миллилитрах (литрах) или массу в граммах (кило-

граммах), концентрацию, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штрих-код.

Для объемов 50,100 мл указывают "Продажа через аптечную сеть".

Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение. В прохладном месте, в хорошо закупоренной таре, вдали от огня.

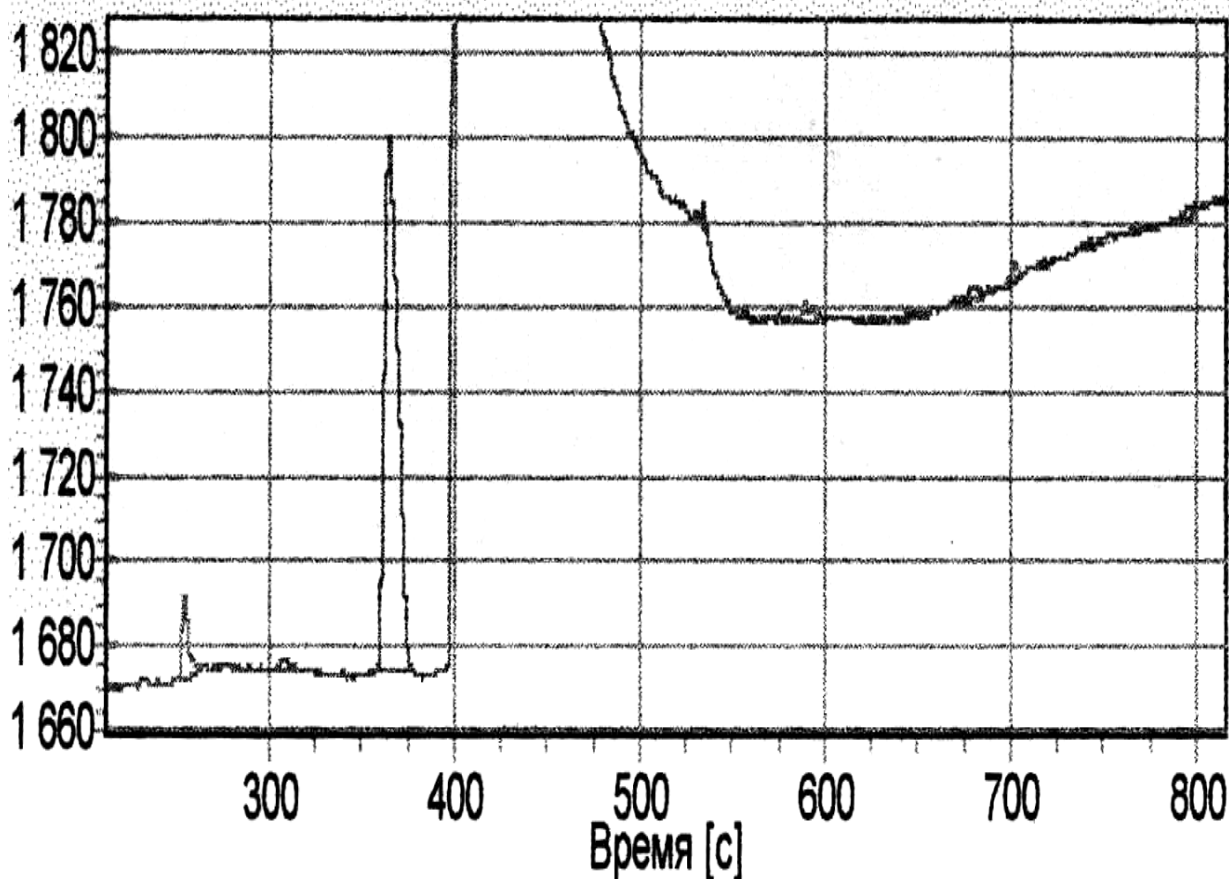
Срок годности 5 лет.

Примечание. Реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи СССР XI издания, вып. 2.

Дата и имя анализа 31.01.02 13:44:59 Спирт_310102_1344.
 Метод Внешний стандарт

Образец & Смесь спирт этиловый , ректификованный & спирт "Люкс"
 Прибор "Трасор"
 Колонка Капиллярная НР-ГГАР-новая 50 [м] * 320 [мкм]
 Термостат 60 + 7*0 + 28*5 + 5*0 + 0*0 + 0*0 + 0*0
 Газ носитель He 40 [C] 80 [кПа]
 Инжектор Шприц 200 [C] Детектор ПИД
 220 [C] Контроллер Com2 NelsonAnalytical 1 +1000 [мВ] 101 [мс]

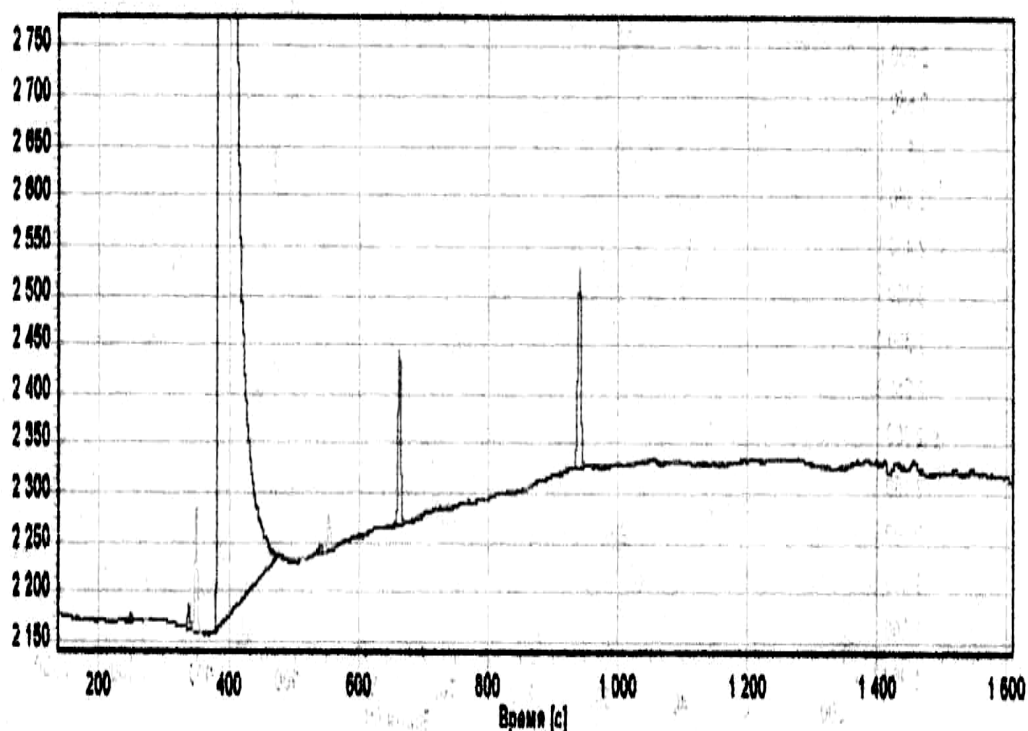
Номер	Время [с]	Высота [мВ]	Площадь [мВ*с]	Количество	Вещество
1	253	21	875	0.697	АЦЕТАЛЬДЕГИД
2	363	126	10506	0.002	МЕТАНОЛ
3	404	25981	684707	0.250	
4	440	43290	7847310	2.861	
5	589	5	261	0.236	Н-ПРОПАНОЛ
8	817	2	221	0.189	Н-БУТАНОЛ
11	1400	21	3354	0.001	
12	1614	3	144	0.000	
13	1626	3	175	0.000	
14	1669	16	1395	0.001	
=====			8549784	4.237	ВСЕГО 14 ПИКОВ



ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Дата и имя анализа 27.06.03 10:42:20
 Метод Внешний стандарт
 Образец спирт
 Прибор "Трасор"
 Колонка Капиллярная HP-FFAP 02.2001 кварцевая 50[m]* 320[micrometers]
 Термостат 60 + 7*0 + 22,2*4,5 + 10*0 + 0*0 + 0*0 + 0*0
 Газ носитель He 40[C] 400[kPa]
 Инжектор Шприц 200[C] Детектор ПИД 220[C] Контроллер
 Sony NelsonAnalytical 1 +1000[mV] 101[ms] канал 1

Номер	Время [с]	Высота [мВ]	Площадь [мВ*с]	Количество	Вещество
1	216	4	335	0,000	
2	248	8	457	0,348	АЦЕТАЛЬДЕГИД
3	271	2	148	0,000	
4	338	24	971	1,385	ЭТИЛАЦЕТАТ
5	349	124	5805	0,001	МЕТАНОЛ
6	516	3	125	0,000	
7	541	6	208	0,000	
8	554	36	1729	2,010	1-ПРОПАНОЛ
9	663	175	7740	0,004	
10	738	5	270	0,000	
11	769	3	223	0,000	
12	859	3	187	0,000	
13	941	201	11136	0,005	
14	1088	3	173	0,000	
			29507	3,753	ВСЕГО 14 ПИКОВ



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Департамента
Государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской
техники

Р.У.ХАБРИЕВ

В соответствии с решением Президиума Фармакопейного комитета
от «19 » апреля 2000 года.

Препарат **Диклофенак**

В лекарственной форме **раствор для инъекций 25 мг/мл в ампулах по 3 мл**

Фирмы-производителя "Шрея Хелскер Пвт Лтд."

Фирмы-заявителя "Шрея Хелскер Пвт Лтд."

Страны Индия

рекомендуется для Перерегистрации

Письмо Департамента № 29-15л/211/38-0213-3

Дата поступления документации в Фармакопейный Государственный
комитет «03»марта 2000 года.

Председатель Фармакопейного
Государственного комитета,
чл.-корр. РАМН

А.П.Арзамасцев

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Диклофенак, раствор для инъекций 25 мг/мл в ампулах по 3 мл

ТЕСТЫ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
ОПИСАНИЕ	визуально	прозрачный бесцветный или слегка желтоватый раствор
ПРОЗРАЧНОСТЬ	ГФХІ, вып.1	раствор должен быть прозрачным
Цветность	ГФХІ, вып.1	раствор должен быть бесцветным в сравнении с водой или выдерживать сравнение с эталоном 6 б
РН	ГФХІ, вып.1	7,0-9,0
МЕХАНИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ	ГФХІ, вып.2	механические включения должны отсутствовать при визуальном контроле
СТЕРИЛЬНОСТЬ	ГФ ХІ, вып.2	Препарат должен быть стерильным; определение проводят методом мембранной фильтрации
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОМИНАЛЬНОГО ОБЪЕМА	ГФ ХІ, вып.2, ст. «Инъекции»	объем препарата в ампуле должен быть не менее номинального
Подлинность	ТСХ УФ-СФМ ГЖХ	соответствие стандарту УФ-спектр раствора, имеет максимум поглощения при 283 ± 2 нм (диклофенак натрия) соответствие стандарту (пропиленгликоль и бензиловый спирт)
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ	УФ-СФМ ГЖХ	22,5-27,5 мг диклофенака натрия/мл 90-110% бензинового спирта пропиленгликоля от заявленного содержания
ПОСТОРОННЫЕ ПРИМЕСИ	ТСХ	отсутствие дополнительных пятен

ПИРОГЕННОСТЬ	ГФ XI, вып.2	препарат должен быть апи-рогенным
УПАКОВКА	По 3 мл в стеклянные ампулы янтарного цвета, 5 ампул помещают в пластиковый поддон, 1, 2, 3 или 4 поддона (5, 10, 15 или 20 ампул) вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.	
МАРКИРОВКА	соответствует НД	
ХРАНЕНИЕ	В защищенном от света месте, при температуре не выше 30 °С	
СРОК ГОДНОСТИ	3 года	
НЕСТЕРОИДНОЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ СРЕДСТВО		

2. Бензилового спирта и пропиленгликоля. Метод ГЖХ.

Условия хроматографирования

Аппарат	стандартное оборудование для газовой хроматографии (Perkin-Elmer 8310) с плазменно-ионизационным детектором
Колонка	15% Apiezonon – L/Chromosorb w HP (80-100 меш), размер 30 м x 0,25 мм или аналогичная
Газ-носитель	аргон
Скорость	40 мл/мин
Поток воздуха	400 мл/мин
Поток водорода	40 мл/мин
Температура колонки	140 °С
Температура инжектора	200°С
температура детектора	220°С
Скорость потока	1 мл/мин
Вводимый объем	1,0 мл
Чувствительность	32

Раствор стандартного образца

Около 400 мг (точная навеска) бензилового спирта и около 2100 мг (точная навеска) пропиленгликоля помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, разбавляют с помощью воды до метки и перемешивают.

Раствор внутреннего стандарта

Около 2000 мг (точная навеска) н-пропанола помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, разбавляют с помощью воды до метки и перемешивают.

Стандартный раствор для введения

Стандартный раствор: Раствор внутреннего стандарта = 1:1 (%)

Испытуемый раствор

Разбавленный раствор для инъекций: Раствор внутреннего стандарта = 1:1 (%)

Расчет

Метод внутреннего стандарта.

$$X \text{ (мг/3 мл)} = \frac{C_{PCO} A_{и 3}}{A_s}$$

где C_{PCO} — концентрация бензилового спирта/пропиленгликоля в рабочем стандартном образце (мг/мл);

$A_s = a_s / a_{BS}$ (площадь пика бензилового спирта/пропиленгликоля в растворе стандартного образца для введения (a_s)/площадь пика внутреннего стандарта в растворе стандартного образца для введения (a_{BS});

$A_{и} = a_{и} / a_{ви}$ (площадь пика бензилового спирта/пропиленгликоля в растворе испытуемого образца ($a_{и}$)/площадь пика внутреннего стандарта в растворе испытуемого образца ($a_{ви}$).

нормы: 90-110% от заявленного содержания бензилового спирта и пропиленгликоля.

*Посторонние примеси. Метод ТСХ**Раствор стандартного образца*

Около 100 мг (точная навеска) РСО диклофенака натрия помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в метаноле и доводят объем раствора метанолом до метки.

На пластинку, покрытую слоем силикагеля 60F-254 ("Мерк" или аналогичную) наносят 2 мкл испытуемого раствора (раствора для инъекций) и 5 мкл раствора стандартного образца. Пластинку помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей толуол:ксилол:диоксан:2-пропанол:концентрированный аммиак:вода (%) (10:10:30:30:17:3).

ПАСПОРТ

Название: Диклофенак от 20.11.2001 г.

Объем, мкл: 1

Единица концентрации: мг/мл

Проба: серия № TD 1080401 от 04.2001г.

Колонка: CE-30

Комментарии:

Пропанол — внутренний стандарт (2000 мг/50мл) в соотношении 1:1 с раствором препарата, разведенного в 5 раз

РЕЖИМ ХРОМАТОГРАФА

Модуль детекторов: ПИД-1/2

Рабочие детекторы: ПИД-1

Время анализа: 0:07:10

Температура детектора, °C: 250

Температура испарителя, °C: 220

КОЛОНКА

	Температура, °C	Время, мин	Скорость, °C /мин
140	0:01:10	10	
180	0:02:00	0	
0	0:00:00	0	
0	0:00:00	0	
0			

Газ-носитель: гелий рас-

ход газа-носителя 1,

мл/мин: 30 Расход газа-

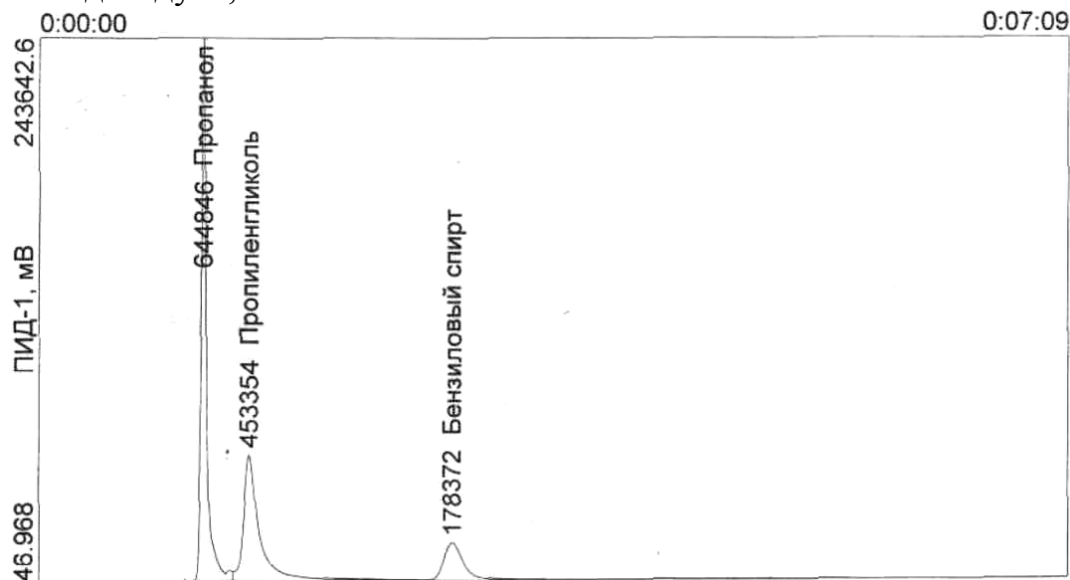
носителя 2, мл/мин: 30

Расход газа-носителя 3,

мл/мин: 20 Расход водоро-

да, мл/мин: 60

Расход воздуха, мл/мин: 600



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
Государственного контроля
лекарственных средств и
медицинской техники
_____ Р.У.Хабриев

В соответствии с решением Президиума Фармакопейного комитета от «19» августа 1998 года.

Препарат **ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТ**

В лекарственной форме **порошок – субстанция**

Фирмы-производителя Ньюлэнд Лабораториз Лимитед

Фирмы-заявителя Хелм АГ, Германия

Страны Индия

рекомендуется для Регистрации

Письмо Управления № 29-15/805

Дата поступления документации в Фармакопейный Государственный комитет «4 » июля 1997 года.

НД 42 – 9121 - 98

Председатель Фармакопейного
Государственного комитета

Ю.Ф. Крылов

Методика определения.

Проводят несколько попарных впрыскиваний раствора стандартного образца и раствора исследуемого образца.

Определяют пригодность системы (фактор симметрии - не выше 1,3.

Относительное стандартное отклонение - не выше 1,0%).

Содержание примесей рассчитывают методом нормирования (по высоте или по площади всех пиков), используя таблицу:

	Время удерживания (мин.)	Относительное время удерживания
1.L – пролин	2,129	0,1660
2.Малеиновая кислота	2.138	0,1667
3.Эналаприлат	2,522	0.1966
4. ЕСРРА*	8.786	0,6850
5. Эналаприла малеат	12.825	1,0000

*- ЕСРРА это - N-(1-этоксикарбонил-3-фенилпропил)-изоаланин. .

ОРГАНИЧЕСКИЕ ЛЕТУЧИЕ ПРИМЕСИ. Метиленхлорид - не более 0,05%;

бензол - не более 0,01%; 1,4-диоксан - не более 0,01%; трихлорэтилен - не более 0,01%; хлороформ - не более 0,005%.

Для определения используют газовый хроматограф с программируемой температурой и ПИД.

Оборудование.

Детектор - ПИД.

Колонка длиной 30 м и диаметром 0,53 мм.

Стационарная фаза - 027. 5 мкм, поперечно-сшитый (химически) или аналогичная.

Предколонка длиной 5 м и диаметром 0,53 мм, кремний деактивированный фенилметилсилоксаном.

Газ-носитель - гелий.

Линейная скорость газа-носителя - 35 см/сек.

Температура инжектора - 70° С.

Температура детектора - 260° С.

Температура колонки - задаётся программой: 35° С в течение 5 мин, повышение до 175° С со скоростью 8° С/мин, затем до 260° С со скоростью 35° С/мин и выдерживают в течение 16 мин.

ПАСПОРТ

Название: Эналаприл малеат - субстанция

Объем, мкл: 1

Единица концентрации: мкг/мл

Проба: серия № СО от 12.08.02 г.

Колонка: СЕ - 54 капиллярная 50 м.

Комментарии:

по 2 мкл СО растворителей на 500 мл воды.

$P = 1,8 \text{ кг/см}^2$

РЕЖИМ ХРОМАТОГРАФА

Модуль детекторов: ПИД-1/2

Рабочие детекторы: ПИД-2

Время анализа: 0:17:00

Температура детектора, °C: 250

Температура испарителя, °C: 200

КОЛОНКА

Температура, °C	Время	Скорость, °C/мин
60	0:06:00	10
160	0:01:00	0
0	0:00:00	0
0	0:00:00	0
0		

Газ-носитель: гелий

Расход газа-носителя 1, мл/мин: 10

Расход газа-носителя 2, мл/мин: 0

Расход газа-носителя 3, мл/мин: 10

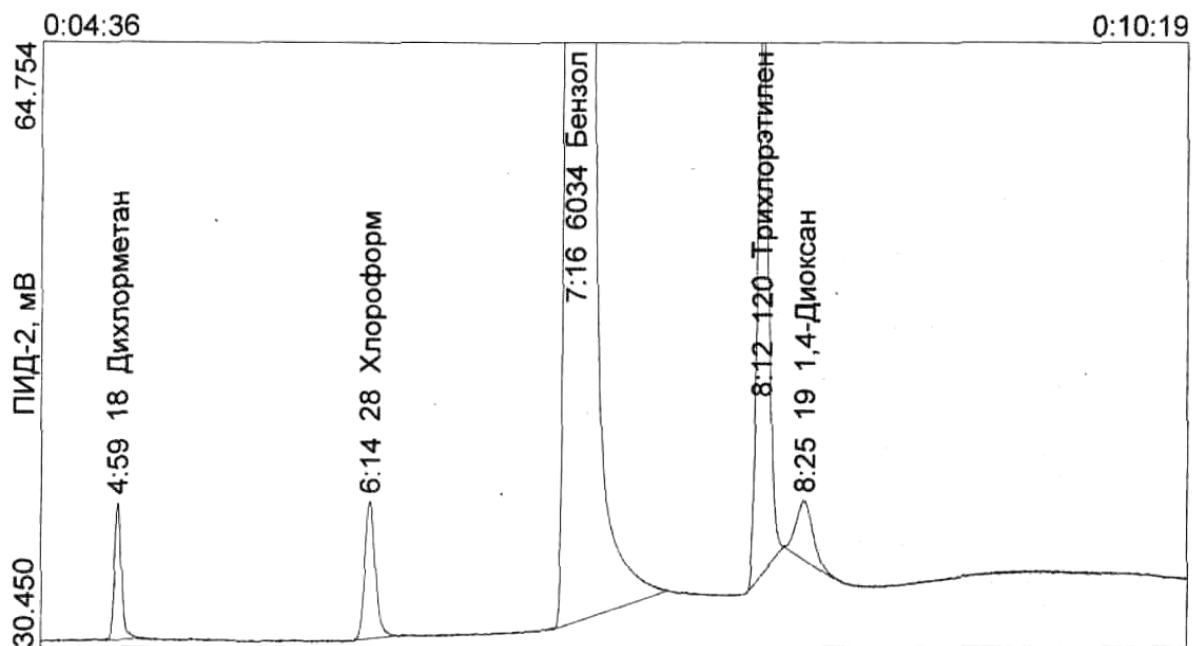
Расход водорода, мл/мин: 30

Расход воздуха, мл/мин: 600

КОМПОНЕНТЫ

Название компонента	Группа	Время	Окно, %	Тип	Детекторы
Дихлорметан		0:04:59	5	Обычный	ПИД-2
Хлороформ		0:06:13	5	Обычный	ПИД-2
Бензол		0:07:16	5	Обычный	ПИД-2
Трихлорэтилен		0:08:11	5	Обычный	ПИД-2
1,4 – Диоксан		0:08:24	5	Обычный	ПИД-2

ХРОМАТОГРАММА



КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ РАСЧЕТ – Процентная нормализация

Название компо...	Груп...	Детект...	Время	Площадь,...	Высота,...	Площадь	Высота,...
Дихлорметан	ПВД-2	0:04:04	3.0567	1.9646	0.049101	0.11957	
Хлороформ	ПВД-2	0:04:59	18.749	7.7152	0.30117	0.46955	
Бензол	ПВД-2	0:06:14	28.312	7.7438	0.45479	0.4713	
Трихлорэтилен	ПВД-2	0:07:16	6034.7	1590.6	96.937	96.803	
1,4-Диоксан	ПВД-2	0:08:12	120.91	31.738	1.9423	1.9316	
	ПВД-2	0:08:25	19.664	3.3665	0.31586	0.20489	
ПВД-2			6225,4	1643,1	100	100	

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления
Государственного контроля ле-
карственных средств и меди-
цинской техники

Р.У. Хабриев

В соответствии с решением Президиума Фармакопейного комитета
от «19 » августа 1998 года,

Препарат **Пенициллин Фау (У)**

В лекарственной форме **порошок-субстанция**

Фирмы-производителя Биохеми ГмбХ

Фирмы-заявителя Фест-Альпине Иетертрейдинг

Страны Австрия

рекомендуется для Регистрации

Письмо Управления № 29-15/551/36-462-1э

Дата поступления документации в Фармакопейный Государственный
комитет «10 » апреля 1998 года.

Председатель Фармакопейного

Государственного комитета

Ю. Ф. Крылов

СПЕЦИФИКАЦИЯ

на препарат «Пенициллин Фау (Y)», фирмы Биохеми ГмбХ», Австрия

ТЕСТЫ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
<u>Описание</u>	визуально	белый кристаллический порошок почти без запаха
<u>Растворимость</u>	ГФ XI	мало растворим в воде (1г/200мл), легко растворим в 96% этаноле (1г/7мл), легко растворим в хлороформе, растворим в фосфатном буферном растворе (рН=7,2), мало растворим в диэтиловом эфире, практически нерастворим в жирных маслах и в вазелиновом масле
<u>Подлинность</u>	ИК-спектрофотометрия, ТСХ, качественная реакция на пенициллины и цефалоспорины	ИК-спектр испытуемого образца имеет максимумы на тех же длинах волн, которые имеет стандартный образец феноксиметилпенициллина, основное пятно, полученное на хроматограмме испытуемого раствора соответствует стандарту, раствор приобретает красно-коричневое окрашивание
<u>Удельное оптическое вращение</u>	Поляриметрический, ГФ XI	1% раствор имеет значение оптического вращения от +186 до +200
<u>Прозрачность</u>	ГФ XI	4% раствор препарата в фосфатном буферном растворе, имеющим рН 7,2 прозрачен по сравнению с фосфатным буферным раствором
<u>Цветность</u>	спектрофотометрический	4% раствор препарата в фосфатном буферном растворе (рН 7,2) при длине волны 425нм имеет оптическую плотность, которая не превышает 20 условных единиц
<u>Кислотность</u>	потенциометрически по ГФ XI	должно быть от 2,5 до 3,5
<u>Поглощение при 306 нм и при 274 нм</u>	спектрофотометрический	абсорбция 0,1% раствора феноксиметилпенициллина в 0,1 М растворе гидроксида натрия имеет оптическую плотность при длине волны 306 нм не более 0,36, абсорбция 0,02% раствора феноксиметилпенициллина в 0,1 М растворе гидроксида натрия имеет оптическую плотность при 274 нм не менее 0,56

Кристалличность	микроскопическое	должно определяться двойное лучепреломление кристаллов препарата
Распределение по размеру частиц	микроскоп	число частиц феноксиметилпенициллина, имеющих размер более 50 мкм, не должно превышать 5% от общего числа частиц в навеске, число частиц феноксиметилпенициллина, имеющих размер более 125 мкм, не должно превышать 1% от общего числа частиц навески, средний размер частиц феноксиметилпенициллина должен находиться в пределах от 4 до 12 мкм, 80% числа всех частиц феноксиметилпенициллина должно находиться в пределах от 2 до 26 мкм
Вода	К.Фишер	не более 0,5%
Феноксиуксусная кислота	ТСХ	не более 0,5%
Количественное определение	меркуриметрическое титрование (определение общего содержания пенициллинов), вэжх	не менее 98,0% и не более 100,5% пенициллинов в пересчете на сухое вещество или не менее 1670 Ед/мг и не более 1730 Ед/мг, не менее 95,0% и не более 100,5% феноксиметилпенициллина в пересчете на сухое вещество
Микробиологическая чистота	ГФХІ	соответствует требованиям ГФХІ
Токсичность	ГФХІ	тест-доза: 0,6 мг /0,5 мл/ на мышь
Остаточные растворители	ГЖХ	не более 1,5% n-бутилацетата и n-бутанола суммарно и не более 0,3% изопропанола
Упаковка		
Маркировка		
Хранение		
Срок годности		5 лет

ОСТАТОЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ

Норма: не более 1,5% n-бутилацетата и n-бутанола суммарно и не более 0,3% изопропанола.

Используют метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором.

Условия хроматографирования:

Колонка: НР-1 (поперечно-сшитый метилполисилоксан), 30 м x 0,53 мм. Толщина пленочного слоя – 2,65 мкм.

Газ-носитель: гелий

Температура инжектора: 200°C

Температура детектора: 200°C

Температура печи: начальная — 37°C, скорость подъема — 30°C/мин, конечная — 60°C.

Время достижения равновесия: 30 мин.

Температура бани: 75°C

Скорость газа-носителя гелия: 10 мл/мин

Скорость газа-носителя азота: 20 мл/мин

Скорость потока воздуха: 400 мл/мин

Скорость потока водорода: 40 мл/мин

Приготовление стандартного раствора.

По 10 мкл изопропанола, n-бутилацетата и n-бутанола и 10 мкл 1- метилизобутилкетона или этилацетат, $\rho=0,901$ (внутренний стандарт) расплавляют в 200 мл воды. Помещают 3 мл этой смеси растворителей в испытываемую хроматографическую пробирку.

Приготовление испытуемого раствора.

Смешивают 10 мкл метилизобутилкетона или этилацетата (внутренний стандарт) с 200 мл воды. В испытываемую хроматографическую пробирку помещают 150 мг феноксиметилпенициллина и растворяют в 3 мл предварительно приготовленного раствора, содержащего раствор внутреннего стандарта. В качестве раствора сравнения используют 3 мл воды. Содержание остаточных растворителей рассчитывают по формуле:

$$\% \text{ остаточного растворителя} = \frac{I_{wp} \times I_{wir} \times f}{I_{wip} \times I_{wir} \times P_p},$$

где I_{wp} — площадь пика растворителя в испытуемом растворе,
 I_{wir} — площадь пика растворителя в стандартном растворе,
 P_p — масса испытуемого вещества (в мг),
 I_{wir} — площадь пика внутреннего стандарта в стандартном растворе,
 I_{wip} — площадь пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе.

$$F = \frac{P_r \times d \times 3 \times C}{200}$$

где P_r — объем растворителя в стандартном растворе (в мкл),
 200 — объем стандартного раствора (в мл),
 3 — объем испытуемого раствора (в мл),
 d — плотность анализируемого растворителя,
 C — процентное содержание основного вещества в стандартном рас-

творителе (чистота).

$\rho = 0,789$ изопропанола; $\rho = 0,810$ н-бутанола; $\rho = 0,880$ н-бутилацетата.

ПАСПОРТ

Название: фау-Пенициллин Объем, мкл:1 Единица концентрации: %

Проба: серия № СО

Колонка: СЕ-30 капиллярный

Комментарии: Растворы СО по 10 мкл на 200 мл воды и 10 мкл этилацетата–внутренний стандарт.

РЕЖИМ ХРОМАТОГРАФА

Модуль детекторов: ПИД-1/2

Рабочие детекторы: ПИД-2

Время анализа: 0:06:10

Температура детектора, °C: 250

Температура испарителя, °C: 200

КОЛОНКА

Температура, °C	Время	Скорость, °C/мин
90	0:02:00	10
130	0:00:10	0
0	0:00:00	0
0	0:00:00	0
0		

Газ-носитель: гелий

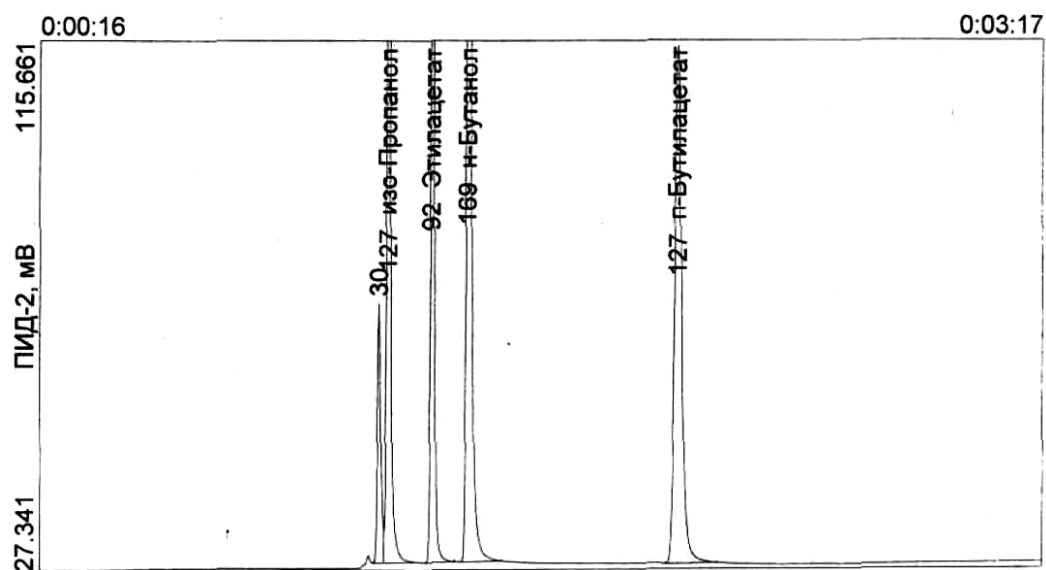
Расход газа-носителя 1, мл/мин: 30

Расход газа-носителя 2, мл/мин: 10

Расход газа-носителя 3, мл/мин: 30

Расход водорода, мл/мин: 30

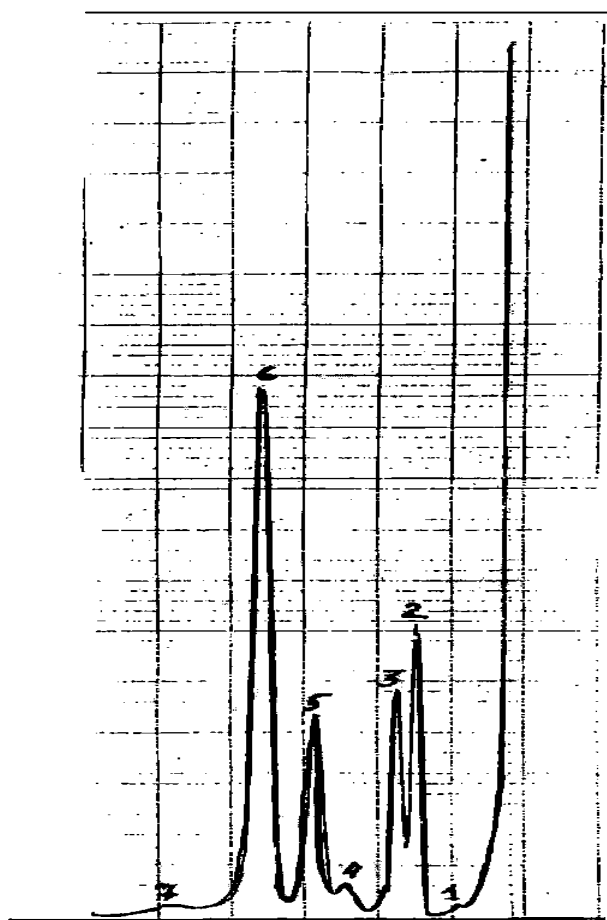
Расход воздуха, мл/мин: 300



Масло облепиховое (ФС 42-1730-95)

Подлинность. 0,03-0,04 мл препарата помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл спирта метилового, 3 капли ацетила хлорида и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Избыток спирта метилового отгоняют. В реакционную смесь прибавляют 0,2 мл гексана и перемешивают. Отбирают 0,5-1,0 мкл смеси с помощью микрошприца и вводят в газожидкостный хроматограф с детектором по ионизации в пламени при следующих условиях: температура колонки – 180⁰С, температура испарителя – 250⁰С, скорость газа-носителя гелия – 30 мл/мин, скорость протяжки ленты 0,15 см/мин, колонка стеклянная длиной 2,4 м, неподвижная фаза – 15% полиэтиленгликосукцинат на хроматоне N-AW-DMCS (0,16-0,25 мм), или (0,250-0,315 мм) (рис.32).

Последовательность выхода пиков на хроматограмме: 1 – эфир метиловый кислоты миристиновой; 2 – эфир метиловый кислоты пальмитиновой; 3 – эфир метиловый кислоты пальмитолеиновой; 4 – эфир метиловый кислоты стеариновой; 5 – эфир метиловый кислоты олеиновой; 6 – эфир метиловый кислоты линолевой; 7 – эфир метиловый кислоты линоленовой.



Метиловые эфиры жирных кислот масла облепихового:

1. миристиновой кислоты;
2. пальмитиновой кислоты;
3. пальмитолеиновой кислоты;
4. стеариновой кислоты;
5. олеиновой кислоты;
6. линолевой кислоты;
7. линоленовой кислоты.

**Рис32. Газожидкостная хроматограмма метиловых эфиров
жирных кислот масла облепихового**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления Государственного
контроля лекарственных средств и
медицинской техники

_____ Р. У. ХАБРИЕВ

В соответствии с решением Президиума Фармакопейного комитета
от "8" октября 1997 г.

Препарат: **Септолете пастилки**

В лекарственной форме: **пастилки**

Фирмы-производителя: КРКА

Страны: Словения

письмо Инспекции № 29-15/550 от 04.04.1997

рекомендуется для Регистрации (Перерегистрации) НД 42-7706-97

Дата поступления документации в Фармакопейный Государственный ко-
митет

"12" 05 1997 г.

Председатель Фармакопейного
Государственного комитета

Ю.Ф.Крылов

СПЕЦИФИКАЦИЯ

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуально	Круглые, двояковыпуклые пастилки зеленого цвета
Масса пастилки Однородность массы	ГФХІ Из 20 пастилок	1,200 г ± 10 %
Идентификация -ментола, тимола, -бензалкония хлорида	Газовая хромато- графия ТСХ	Соответствует Соответствует
Распадаемость	ГФХІ	Не более 60 мин в воде при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Количественное определение - ментол - тимол - бензоалкония хлорид	Газовая хроматография Газовая хроматография Титриметрия	Не менее 1,0 мг / ср. вес пастилки Не менее 0,5 мг / ср. вес пастилки 1,0 мг/ ср. вес пастилки ± 15 %
Микробиологическая чистота	ГФХІ	Категория 3 г
Упаковка		В блистеры по 10 пластилок. 3 блистера вместе с инструкцией по применению в картонной коробке
Маркировка		Соответствует
Срок годности		3 года
Условия хранения		В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МЕНТОЛА И ТИМОЛА

Метод: газовая хроматография.

Идентификация ментола и тимолола:

Время удерживания пика ментола на хроматограмме, полученной от испытуемого раствора для введения, должно соответствовать времени удерживания пика ментола на хроматограмме, полученной от стандартного раствора для введения.

Время удерживания пика тимолола на хроматограмме, полученной от испытуемого раствора для введения, должно соответствовать времени удерживания пика тимолола на хроматограмме, полученной от стандартного раствора для введения

Условия хроматографирования:

Оборудование: соответствующий газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором (FID)

Колонка: капиллярная SPB 5 (30 м x 0.32 мм, толщина слоя 0,25 мкм)

Газ-носитель: Азот, скорость: 1,8 мл/мин, разделение потока 55:1

Поток воздуха: 400 мл/мин

Поток водорода: 40 мл/мин

Температура колонки: 120°C

Температура инжектора: 170°C

Температура детектора: 190°C

Введение проб: 10мкл

Стандарты:

1. Ментол, эталонное вещество
2. имол, эталонное вещество
3. Камфора (D-камфора), эталонное вещество

Реагенты:

1. Хлороформ, ч.д.а.
2. Вода, деминерализованная
3. Безводный Na₂SO₄, ч.д.а.

Растворы для проведения хроматографии:

Раствор внутреннего стандарта:

Точно взвесьте 12,0 мг камфоры и перенесите в мерную колбу вместимостью 100 мл. Растворите и наполните с помощью хлороформа до метки.

Стандартный раствор:

Взвесьте количество плацебо, которое соответствует весу 10 пастилок, затем точно взвесьте 12,0 мг ментола и 6,0 мг тимола. Перенесите в делительную воронку, вместимостью 250 мл, и хорошо перемешайте с 100 мл воды. Экстрагируйте 3 раза, используя каждый раз 70 мл хлороформа (каждый раз взбалтывайте в течение 5 минут). Профильтруйте слой хлороформа через безводный Na_2SO_4 в колбу вращающегося испарителя. Затем удалите хлороформ посредством дистилляции до сухости. Количественно перенесите сухой остаток в мерную колбу вместимостью 100 мл и наполните с помощью хлороформа до метки.

Стандартный раствор для введения:

Соедините стандартный раствор и раствор внутреннего стандарта в отношении 1:1 (V/V).

Испытуемый раствор:

Взвесьте количество порошка из пастилок, которое соответствует весу 10 пастилок, перенесите в делительную воронку вместимостью 250 мл и хорошо перемешайте с 100 мл воды. Экстрагируйте 3 раза, используя каждый раз 70 мл хлороформа (каждый раз взбалтывайте в течение 5 минут). Профильтруйте слой хлороформа через безводный Na_2SO_4 в колбу вращающегося испарителя. Затем удалите хлороформ посредством дистилляции до сухости. Количественно перенесите сухой остаток в мерную колбу вместимостью 100 мл и наполните с помощью хлороформа до метки.

Испытуемый раствор для введения:

Соедините стандартный раствор и раствор внутреннего стандарта в отношении 1:1 (V/V).

Наладка хроматографической системы:

В уравновешенную хроматографическую систему введите стандартный раствор для введений 5 раз и запишите хроматограммы. Вычислите:

- Относительное стандартное отклонение (RSD) площади пиков отдельных компонентов стандартного раствора для 5 повторных введений проб не должно превышать 2%.

- Разрешение (R): пики отдельных компонентов должны хорошо отделяться друг от друга, R между камфорой и ментолом должно быть не менее 2, а R между ментолом и тимолом должно быть не менее 15.

Если требования относительно наладки хроматографической системы при данных условиях хроматографии не выполнены, тогда можно изменить температуру и скорость.

Вычисление: метод внутреннего стандарта.

$$\text{Содержание ментола (мг/ср. вес таблетки)} = \frac{C_{st} \times A_{sa} \times av.wt}{C_{sa} \times A_{st}}$$

$$A_{st} = \frac{a_{st}}{a_{ist}} \quad A_{sa} = \frac{a_{sa}}{a_{isa}}$$

C_{st} — концентрация ментола в стандартном растворе (мг/мл);
 C_{sa} — концентрация порошка из таблеток в испытуемом растворе (мг/мл);
 a_{st} — площадь пика ментола на хроматограмме стандартного раствора для введения; a_{sa} — площадь пика ментола на хроматограмме испытуемого раствора для введения; $av.wt$ — средний вес таблетки;
 a_{ist} — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора для введения; a_{isa} — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора для введения.

$$\text{Содержание тимолола (мг/ср. вес таблетки)} = \frac{C_{st} \times A_{sa} \times av.wt}{C_{sa} \times A_{st}}$$

$$A_{st} = \frac{a_{st}}{a_{ist}} \quad A_{sa} = \frac{a_{sa}}{a_{isa}}$$

C_{st} — концентрация тимолола в стандартном растворе (мг/мл);
 C_{sa} — концентрация порошка из таблеток в испытуемом растворе (мг/мл);
 a_{st} — площадь пика тимолола на хроматограмме стандартного раствора для введения; a_{sa} — площадь пика тимолола на хроматограмме испытуемого раствора для введения; $av.wt$ — средний вес таблетки; a_{ist} — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора для введения;
 a_{isa} — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора для введения.

ПАСПОРТ

Название: Септолете таблетки от 26.11.2001 г. Оператор: Садовников В.В.

Объем, мкл: 5 Единица концентрации: мг/мл

Проба: серия № 3280 от 09.01 г.

Колонка: СЕ-30 стекло

Комментарии: Раствор препарата, после извл-ия и раств-я в 50 мл.

хлороформа + Камфоры 6,0 мг — внутренний стандарт 1:1

РЕЖИМ ХРОМАТОГРАФА

Модуль детекторов: ПИД-1/2

Рабочие детекторы: ПИД-1

Время анализа: 0:12:00

Температура детектора, °C: 230

Температура испарителя, °C: 200

КОЛОНКА

Температура, °C	Время	Скорость, °C/мин
120	0:05:00	20
190	0:03:00	0
0	0:00:00	0
0	0:00:00	0

Газ-носитель: гелий

Расход газа-носителя 1, мл/мин: 30

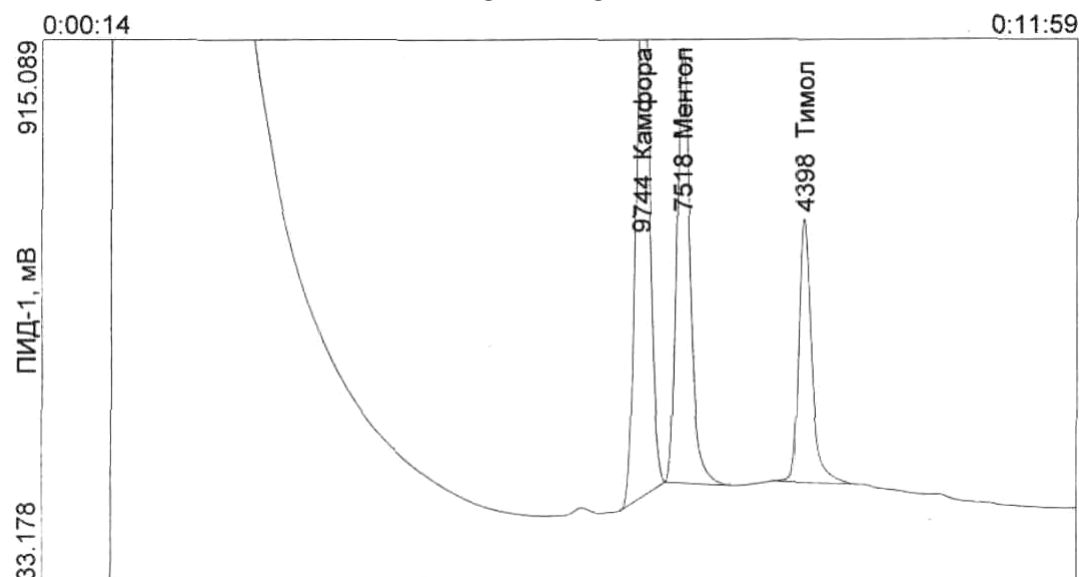
Расход газа-носителя 2, мл/мин: 30

Расход газа-носителя 3, мл/мин: 20

Расход водорода, мл/мин: 60

Расход воздуха, мл/мин: 600

ХРОМАТОГРАММА



ПРЕПАРАТ ЭНАП**Приложение 2**

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ТАБЛЕТКИ по 10 и 20 мг

МЕЖДУНАРОДНОЕ НЕПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ ЭНАЛАПРИЛ

ФИРМА ПРОИЗВОДИТЕЛЬ/ЗАЯВИТЕЛЬ

КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ / КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ

СТРАНА СЛОВЕНИЯ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ГРУППА

ИНГИБИТОР АПФ

СПЕЦИФИКАЦИЯ**ЭНАП, таблетки по 10 мг Фирма КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ/ КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ**

ТЕСТ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуально	Круглые, плоские таблетки Красновато-коричневого цвета со Скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки
Средняя масса * и однородность по массе	Европейская фармакопея или ГФ XI, вып. 2	0,170 г $\pm$ 7,5%* Масса 18 из 20 таблеток отклоняется от средней массы таблеток не более, чем на $\pm$ 7,5% и масса 2 из 20 таблеток отклоняется не более чем, на $\pm$ 15%
Распадаемость	Европейская фармакопея или ГФ XI вып. 2, с. 154	Не более 15 минут в воде при температуре 37°C $\pm$ 1°C
Идентификация эналаприла малеата	ВЭЖХ	Соответствует стандарту
Родственные вещества: - спецификация выпуска	ВЭЖХ	 В сумме: не более 1,0 %

- спецификация срока годности		В сумме: не более 5,0 %
Растворение эналаприла малеата	ВЭЖХ, лопастная мешалка, 50 об/мин, 900 мл воды очищен- 37°C±0,5°C	Не менее 80% (Q) от заявленного количества в течение 30 минут
Однородность дозирования эналаприла малеата	ВЭЖХ	85,0-115,0% от заявленного количества RSD: не более чем 60,% (n = 10)
Количественный анализ эналаприла малеата	ВЭЖХ	95,0 %-105,0 % от заявленного количества
Микробиологическая чистота	ГФХ1	Категория 3 г
Упаковка		Coldforming OPA/ AL/PVC - AL блистер по 10 таблеток. 2 блистера в картонной коробке вместе с инструкцией по применению. «Ин-балк» упаковка: В транспортной коробке 1000-2500 блистеров (блистер по 10 таблеток).
Маркировка		Соответствует НД
Срок годности		3 года
Условия хранения		При температуре до 25°C, в защищенном от влаги месте
Фармакологическая		Ингибитор АПФ

* Показатель «средняя масса» включен по требованию Фармкомитета.
Фирма гарантирует качество препарата по этому показателю.

СПЕЦИФИКАЦИЯ**ЭНАП, таблетки по 20 мг****Фирма КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ/ КРКА, д.д., СЛОВЕНИЯ**

ТЕСТ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуально	Круглые, плоские таблетки светло-оранжевого цвета со скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки.
Средняя масса * и однородность по массе	Европейская фармакопея или ГФ XI, вып. 2	0,170 г $\pm 7,5\%$ * Масса 18 из 20 таблеток отклоняется от средней массы таблеток не более чем на $\pm 7,5\%$ и масса 2 из 20 таблеток отклоняется не более чем на $\pm 15\%$
Распадаемость	Европейская фармакопея или ГФ XI вып. 2, с.154	Не более 15 минут в воде при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Идентификация эналаприла малеата	вэжх	Соответствует стандарту
Родственные вещества: - спецификация выпуска - спецификация срока годности	вэжх	При выпуске в сумме не более 1,0 % ; в конце срока годности в сумме не более 5,0%
Растворение эналаприла малеата	вэжх, лопастная мешалка, 50 об/мин, 900 мл воды очищенной, $37^{\circ}\text{C} + 0,5^{\circ}\text{C}$	Не менее 80% (0) от заявленного количества в течение 30 минут
Однородность дозирования эналаприла малеата	ВЭЖХ	85,0%-115,0% от заявленного количества RSD: не более чем 6,0 % (n = 10)
Количественный анализ эналаприла малеата	вэжх	95,0 %-105,0 % от заявленного количества
Микробиологическая чистота	ГФХ1	Категория 3 г

Упаковка		Coldforming OPA/ AL/ PVC – AL блистер по 10 таблеток. 2 блистера в картонной коробке вместе с инструкцией по применению. «Инбалк» упаковка: В транспортной коробке 1000-2500 блистеров (блистер по 10 таблеток)
Маркировка		Соответствует НД
Срок годности		3 года
Условия хранения		При температуре до 25°C, в защищенном от влаги месте
Фармакологическая группа		Ингибитор АПФ

* Показатель «средняя масса» включен по требованию Фармкомитета;
Фирма гарантирует качество препарата по этому показателю.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ НА ПРЕПАРАТ «ЭНАП» ТАБЛЕТКИ 10 и 20 мг,

ФИРМА КРКА д.д. СЛОВЕНИЯ/ КРКА, д.д.СЛОВЕНИЯ
СОСТАВ:

1 таблетка (по 10 мг)содержит:

Эналаприл малеат	USP 23	10,00 мг
Натрия гидрокарбонат	Ph. Eur. 3	5,10 мг
Моногидрат лактозы	Ph. Eur. 3	124,60 мг
Кукурузный крахмал	Ph. Eur. 3	21,40 мг
Тальк	Ph. Eur. 3	6,00 мг
Стеарат магния	РБ. Eur. 3	1,70 мг
Красящее вещество Sicopharm Rot 30,		

С. 1.77491 BASF 1,20 мг

1 таблетка (по 20 мг) содержит:

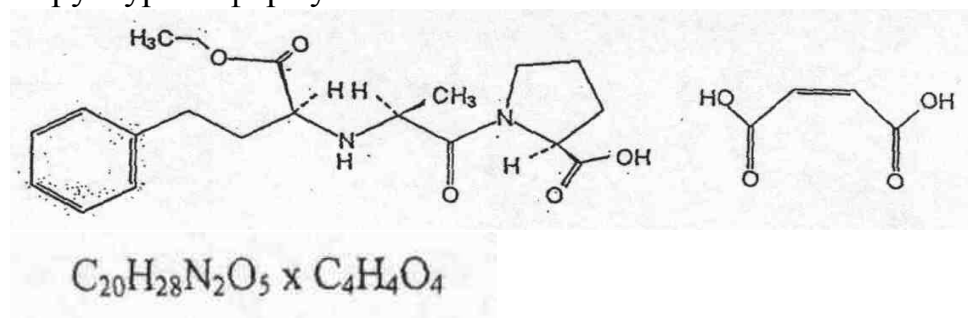
Эналаприл малеат	USP 23	20,00 мг
Натрия гидрокарбонат	Ph. Eur. 3	10,20 мг
Моногидрат лактозы	Ph. Eur. 3	117,80 мг
Кукурузный крахмал	Ph. Eur. 3	13,90 мг
Тальк	Ph. Eur. 3	6,00 мг
Стеарат магния	Ph. Eur. 3	1,70 мг
Красящее вещество Sicopharm Rot 30, С. 1.77491	BASF	0,10 мг
Красящее вещество Sicopharm Rot 30, С. 1.77492	BASF	0,30 мг

АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ

Эналаприла малеат: 1-[N-[(S)-1 карбокси-3фенилпропил]-L-аланин] - L-пролин-1'-этил эфир, малеат (1 : 1)

МНН: эналаприл

Структурная формула:



Относительная молекулярная масса: 492,53

ОПИСАНИЕ:Таблетки по 10 мг:

Круглые, плоские таблетки красновато-коричневого цвета со скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки.

Таблетки по 20 мг:

Круглые, плоские таблетки светло-оранжевого цвета со скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки.

Оценку проводят визуально.

СРЕДНЯЯ МАССА И ОДНОРОДНОСТЬ ПО МАССЕ *

НОРМА: таблетки 10 и 20 мг

Средняя масса: $0,170 \text{ г} \pm 7,5\%$

Масса 18 из 20 таблеток отклоняется от средней массы таблеток не более чем $\pm 7,5\%$ и масса 2 из 20 таблеток отклоняется не более чем $\pm 15\%$,

Определение проводят по ГФ XI. вып. 2, с.154.

РАСПАДАЕМОСТЬ:

Определение проводят по ГФ XI, вып.2

НОРМА: Не более 15 минут в воде при температуре $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА

НОРМА: 85.0% - 115.0% от заявленного количества RSD: не более 6.0% (n=10)

Метод

Высокоэффективная жидкостная хроматография, метод внешнего стандарта.

Оборудование:

Жидкостной хроматограф с переменным УФ-детектором и колонкой термостатом.

Стандарт:

1. Эналаприл малеат: основной рабочий стандарт.

Растворители и реагенты:

1. Вода: очищенная, для ВЭЖХ.
2. Ацетонитрил, CH_3CN : ацетонитрил R 1(Европ. фарм., для ВЭЖХ)
3. Калия дигидрогенфосфат, KH_2PO_4 : для ВЭЖХ.
4. Фосфорная кислота H_3PO_4 ,: мин. 85%, ч.д.а.
5. Фосфатный буфер pH 2,0: Взвесить 136 мг KH_2PO_4 в 1000 мл мерную колбу, растворить в 800 мл воды, довести pH раствора до 2,0 фосфорной кислотой и разбавить водой до метки. Перемешать и отфильтровать полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм;
6. Растворитель: фосфатный буфер pH 2,0

Хроматографические условия:

Колонка: Hypersil BDS C-18, частицы 3 мкм, 100 мм х 4 мм, с предколонкой для обратной фазы.

Примечание: Может использоваться равноценная колонка, наполненная обратной фазой RP C 18 (октадецил силан) с пониженной активностью. При необходимости можно незначительно корректировать скорость и/или состав подвижной фазы до достижения пригодности хроматографической системы.

Температура колонки: 70°C

Подвижная фаза: фосфатный буфер pH 2,0 ; ацетонитрил - 17 : 8 (V/V)

Перед использованием фильтруют подвижную фазу через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и дегазируют ее (с помощью ультразвука или гелия).

Скорость: около 1,5 мл/мин

Обнаружение: УФ, длина волны 215 нм

Объем вводимой пробы: 10 мкл

Растворы для ВЭЖХ измерений

Стандартный раствор (SS)

Точно взвешивают 10 мг стандарта эналаприла малеата в 50 мл мерную колбу, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки (55; 0,2 мг эналаприла малеата/мл)

Испытуемый раствор (SaS)

Для испытания произвольно отбирают 10 таблеток. Каждую таблетку помещают в соответствующую мерную колбу, вместимостью (см. таблицу) и добавляют растворитель до метки. Воздействуют ультразвуком до полной распадаемости таблеток (в течение около 20 минут).

Центрифугируют часть суспензии при 3000 об/мин в течение 10 минут.

Прозрачный центрифугат является испытуемым раствором (SaS). При необходимости фильтруют центрифугат через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. (SaS: 0,2 мг эналаприла малеата/мл)

Заявленное количество эналаприла малеата в таблетке (мг)	Объем мерной колбы (мл)
10	50
20	100

Процедура

Пригодность хроматографической системы

В уравновешенную хроматографическую систему вводят 5 раз по 10 мкл стандартного раствора (SS). На хроматограмме этого раствора пик эналаприла следует за пиком малеиновой кислоты.

Вычисляют **коэффициент разделения R** между пиками малеиновой кислоты и эналаприла и **относительное стандартное отклонение (RSD)** для площади пика эналаприла для пяти повторных введений стандартного раствора (SS).

Принятые критерии:

Критерии	Требование
Коэффициент разделения R	Не менее 5
Воспроизводимость, RSD % (n=5)	Не более 2,0%

Примечание: Если тест *Количественный анализ эналаприла малеата* является продолжением теста *Однородность дозирования*, проверку пригодности хроматографической системы не проводят.

Анализ

После проверки пригодности хроматографической системы выполняют калибровку для эналаприла малеата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят 10 мкл испытуемого раствора (SaS). Записывают хроматограмму и отмечают характеристики (время удерживания и площадь пика) эналаприла.

Вычисляют содержание эналаприла малеата в % относительно заявленного количества.

Вычисление

$$\% \text{ эналаприла малеата} = \frac{C_{ss} \cdot A_{SaS} \cdot V}{A_{ss} \cdot 1 \cdot SA} \cdot 100$$

A_{SaS} – площадь пика эналаприла на хроматограмме испытуемого раствора (SaS)

A_{ss} – среднее значение площади пика эналаприла на хроматограмме Стандартного Раствора (SS)

C_{ss} – концентрация эналаприла малеата в Стандартном Растворе (SS), в мг/мл

V – объем мерной колбы, в мл

1 – количество таблеток, используемых для приготовления Испытуемого Раствора (SaS), в мг.

SA – заявленное количество эналаприла малеата в одной таблетке в мг

100 – коэффициент пересчета в %

РОДСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА.

НОРМА:

Спецификация выпуска в сумме: не более 1,0 %

Спецификация срока годности в сумме: не более 5,0 %

Метод

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), метод внешнего

стандарта.

Оборудование:

Жидкостной хроматограф с переменным Уф-детектором и колонкой термостатом.

Стандарты:

1. Эналаприл малеат (ЕМ); основной рабочий стандарт;
2. Эналаприлат (ЕТ): основной рабочий стандарт;
ЕТ: 1-[N-(5)-карбокси-3фенилпропил]-L-аланин]-L-пролиндигидрат

Растворители и реагенты:

1. Вода: очищенная, для ВЭЖХ.
2. Ацетонитрил, CH₃CN: ацетонитрил R1(Европ. фарм. для ВЭЖХ)
3. Калия дигидрогенфосфат, KH₂P04 : для ВЭЖХ.
4. Фосфорная кислота H₃P04, : мин. 85%, ч.д.а,
5. Фосфатный буфер рН 2,0: Взвесить 136 мг KH₂P04 в 1000 мл мерную колбу, растворить в 800 мл воды, довести рН раствора до 2,0 фосфорной кислотой и разбавить водой до метки. Перемешать и отфильтровать полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм;
6. Растворитель: фосфатный буфер рН 2,0

Хроматографические условия:

Колонка: Hypersil ODS C-18, 250 мм x 4мм.

Примечание: Также может использоваться другая равноценная колонка, наполненная обратной фазой C 18 (октадецил силан) с пониженной активностью. При необходимости можно слегка корректировать скорость и/или состав подвижной фазы до достижения пригодности хроматографической системы.

Температура колонки: 70°C.

Подвижная фаза: фосфатный буфер рН 2,0 : ацетонитрил = 60 : 40 (V/V)

Примечание: При необходимости соотношение компонентов в подвижной фазе можно изменить (соотношение 63 : 37 (V/V) также допустимо) для достижения пригодности хроматографической системы.

Перед использованием фильтруют подвижную фазу через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют ее (с помощью ультразвука или гелия).

Скорость: около 1,0 мл/мин

Обнаружение: УФ, длина волны 215 нм

Объем вводимой пробы: 20 мкл

Растворы для ВЭЖХ измерений

Стандартный раствор (SS)

Точно взвешивают 5 мг стандарта эналаприла малеата в 50 мл мерную колбу, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки. Переносят пипеткой 1,0 мл этого раствора в 10 мл мерную колбу и доводят растворителем до метки. (53: 0,01 мг эналаприла малеата/мл = 1,0 % отно-

сительно концентрации эналаприла малеата в Испытуемом Растворе (SS))
Эналаприлат Стандартный Раствор (ESS)

Точно взвешивают 5 мг стандарта эналаприлата в 50 мл мерную колбу, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки.

(ESS: 0,1 мг эналаприлата/мл)

Раствор для Контроля Селективности (SSC)

Взвешивают 10 мг стандарта эналаприла малеата в 10 мл мерную колбу, добавляют пипеткой 1,0 мл Эналаприлата Стандартного Раствора (ESS) и доводят растворителем до метки.

(SSC: 1 мг эналаприла малеата (100%) и 0,01 мг эналаприлата (1,0%)/мл)

Испытуемый раствор (SaS)

Взвешивают 20 таблеток и определяют среднюю массу таблетки. Помещают соответствующее количество целых таблеток (см. таблицу) в колбу Эрленмейера, добавляют пипеткой соответствующее количество растворителя (см. таблицу) и воздействуют ультразвуком до полной распадаемости таблеток (в течение около 20 минут). Центрифугируют часть суспензии при 3000 об/мин в течение 10 минут. При необходимости фильтруют центрифугат через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный центрифугат является Испытуемым Раствором (SaS). (SaS : 1.0 мг эналаприла малеата/мл)

Заявленное количество эналаприла малеата в таблетке (мг)	Количество таблеток, используемых для приготовления Испытуемого Раствора (SaS)	Добавленное количество растворителя (мл), используемое для приготовления Испытуемого раствора (SaS)
10	10	100
20	5	100

Процедура

Пригодность хроматографической системы

В уравновешенную хроматографическую систему вводят 20 мкл растворителя и затем 20 мкл Раствора для контроля селективности (SSC). На хроматограмме этого раствора пики эналаприлата и эналаприла следуют за пиком малеиновой кислоты. Вычисляют **коэффициент разделения K** между отдельными пиками.

Затем вводят 5 раз по 20 мкл стандартного раствора (SS) и вычисляют **относительное стандартное отклонение (RSD)** площадей пика эналаприла для пяти повторных введений стандартного раствора (SS).

Принятые критерии:

Критерий	Требование
Коэффициент разделения К между: - пиком малеиновой кислоты и пиком эналаприлата; пиком эналаприлата и пиком эналаприла	Не менее 2, не менее 5
Воспроизводимость, RSD % (n=5) – для пика эналаприла	Не более 2,0 %

Анализ

После проверки пригодности хроматографической системы выполняют калибровку для эналаприла малеата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят 20 мкл испытуемого раствора (SaS). Записывают хроматограмму и отмечают площади пиков родственных веществ. Время хроматографирования должно в 2 раза превышать время удерживания пика эналаприла.

Вычисляют процентное содержание отдельных родственных веществ и сумму родственных веществ.

Вычисление

$$\% \text{ родственного вещества } X_i = \frac{C_{ss,EM} \cdot A_{SaS,X_i} \cdot a.m. \cdot V}{A_{ss,EM} \cdot W_{sa} \cdot SA} \cdot 100$$

$C_{ss,EM}$ – концентрация эналаприла малеата в стандартном растворе (SS), в мг/мл

$A_{ss,EM}$ – среднее значение площади пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора (SS)

A_{SaS,X_i} – площадь пика отдельного родственного вещества (X_i) на хроматограмме испытуемого раствора (SaS)

$a.m.$ – средняя масса таблетки, в мг

V – объем добавленного растворителя для приготовления испытуемого раствора (SaS), в мл

W_{sa} – вес соответствующего количества целых таблеток, используемых для приготовления испытуемого раствора (SaS), в мг

SA – заявленное количество эналаприла малеата в одной таблетке, в мг

100 – коэффициент пересчета в %

% суммы родственных веществ = $\sum$ % отдельных родственных веществ.

РАСТВОРЕНИЕ ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА

НОРМА: Не менее 80% (Q) от заявленного количества через 30 минут.

Аппарат: 2; лопастная мешалка (Америк. Фармакопея и/или Европ. Фармакопея)

- скорость вращения; 50 об/мин
- расстояние между внутр. дном сосуда и лопаткой: 25 ± 2 мм

Условия растворения:

- среда растворения: очищенная вода, для ВЭЖХ (перед использованием из среды удалить воздух)
- объем среды растворения; 900 мл
- температура среды растворения: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- время взятия пробы: 30 минут

Реагент:

Очищенная вода, для ВЭЖХ.

Процедура:

Протестировать 6 таблеток.

Помещают 900 мл среды растворения в каждый из сосудов для растворения и уравнивают среду до $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Затем через соответствующие интервалы времени помещают по 1 таблетке в каждый сосуд, быстро включают аппарат и отмечают время. Точно через 30 минут отбирают 20 мл испытуемого раствора из каждого сосуда и фильтруют его через мембранный фильтр с диаметром пор 0,8 мкм (миллипоры тип АА). Отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

МЕТОД

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), метод внешнего стандарта.

Оборудование:

Жидкостной хроматограф с переменным УФ-детектором и колонкой термостатом.

Стандарты:

1. Эналаприл малеат - основной рабочий стандарт;

Растворители и реагенты:

1. Вода: очищенная, для ВЭЖХ.
2. Ацетонитрил, СН₃СМ: ацетонитрил К1 (Европ. фармакопея, для ВЭЖХ).
3. Калия дигидрогенфосфат, КН₂Р0₄ : для ВЭЖХ.
4. Фосфорная кислота НЗР0₄, : мин. 85%, ч.д.а.
5. Фосфатный буфер рН 2,0: Взвесить 136 мг КН₂Р0₄ в 1000 мл мерную колбу, растворить в 800 мл воды, довести рН раствора до 2,0 фосфорной кислотой и разбавить водой до метки. Перемешать и отфильтровать полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор – 0,45 мкм;

Хроматографические условия:

Колонка: Hypersil BDS C-18, частицы 3 мкм, 100 мм x 4 мм с предколонкой для обратной фазы.

Примечание: Также может использоваться другая равноценная колонка, наполненная обратной фазой С 18 (октадецилсилан) с пониженной активностью хроматографической системы.

Температура колонки: 70°C

Подвижная фаза: фосфатный буфер pH 2,0 : ацетонитрил = 17:8 (V/V)

Перед использованием отфильтровать подвижную фазу через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировать ее (с помощью ультразвука или гелия).

Скорость: около 1,5 мл/мин

Обнаружение: УФ, длина волны 215 нм

Объем вводимой пробы: 20 мкл

Растворы для ВЭЖХ измерений

Стандартный раствор (SS)

Точно взвешивают 10 мг стандарта эналаприла малеата в 50 мл мерную колбу, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки (SS1).

Переносят пипеткой соответствующее количество раствора SS1 в подходящую мерную колбу (См. таблицу) и доводят водой до метки.

Заявленное количество эналаприла малеата в таблетке (мг)	Объем мерной колбы (мл)	Отобранное (перенесенное) количество раствора SS1	Приблизительная концентрация SS (мг/мл)
10	20	1	0,01
20	10	1	0,02

Испытуемый раствор (SaS1-SaS6)

Растворы получены при проведении вышеописанной процедуры теста «растворение» (1 таблетка/900 мл воды).

Процедура

Пригодность хроматографической системы

В уравновешенную хроматографическую систему вводят 5 раз по 20 мкл Стандартного Раствора (SS). На хроматограмме этого раствора пик эналаприла следует за пиком малеиновой кислоты. Вычисляют относительное стандартное отклонение (RSD) для площади пика эналаприла для пяти повторных введений стандартного раствора (SS).

RSD не должно превышать 2,0 %

Анализ.

После проверки пригодности хроматографической системы выполняют калибровку для эналаприла малеата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят 20 мкл Испытуемого Раствора (SaS). Записывают хроматограмму и отмечают характеристику (площадь пика) эналаприла.

Вычисляют процент растворенного эналаприла малеата относительно заявленного количества.

Вычисление:

$$\% \text{ эналаприла малеата} = \frac{C_{ss} \bullet A_{SaS} \bullet 900}{A_{ss} \bullet 1 \bullet SA} \bullet 100$$

ASaS – площадь пика эналаприла на хроматограмме испытуемого раствора (SaS)

Ass – среднее значение площади пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора (SS)

Css – концентрация эналаприла малеата в стандартном растворе (SS), в мг/мл

900 – объем среды растворения, в мл

1 – количество таблеток, используемых для приготовления испытуемого раствора (SaS), в мг.

SA – заявленное количество эналаприла малеата в одной таблетке, в мг

100 – коэффициент пересчета, в %.

Результаты должны удовлетворять следующим критериям приемлемости

Стадия	Количество тестируемых единиц	Критерий приемлемости (количество активного ингредиента, высвободившегося в % от содержания активного компонента)
S1	6	Каждая единица не менее $Q + 5\%$
S2	6	Среднее значение из 12 единиц (S1+S2) равно или более 0 и не должно быть единиц менее $Q - 15\%$.
S3	12	Среднее значение из 24 единиц (S1+S2+S3) не менее Q , допускается наличие 2 единиц менее $Q - 15\%$ и не должно быть единиц менее $Q - 25\%$

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА

НОРМА:

95.0 %-105,0 % от заявленного количества

Метод

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), метод внешнего стандарта.

Оборудование:

Жидкостной хроматограф с переменным УФ-детектором и колонкой термостатом.

Стандарты:

1. Эналаприл малеат: основной рабочий стандарт.

Растворители и реагенты:

1. Вода: очищенная, для ВЭЖХ.

2. Ацетонитрил, CH₃CN: ацетонитрил R1(Европ. фармакопоя, для ВЭЖХ)

3. Калия дигидрогенфосфат, $\text{KH}_2\text{P04}$: для ВЭЖХ.

4. Фосфорная кислота $\text{H}_3\text{P04}$; мин. 85%, ч.д.а.

5 Фосфатный буфер рН 2,0: Взвесить 136 мг $\text{KH}_2\text{P04}$ в 1000 мл мерную колбу, растворить в 800 мл воды, довести рН раствора до 2,0 фосфорной кислотой и разбавить водой до метки. Перемешать и отфильтровать полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

6. Растворитель: фосфатный буфер рН 2,0

Хроматографические условия:

Колонка: Nupersil BDS C-18, частицы 3 мкм, 100 мм x 4 мм, с предколонкой для обратной фазы.

Примечание: Может использоваться равноценная колонка, наполненная обратной фазой КР С 18 (октадецил силан) с пониженной активностью. При необходимости можно слегка корректировать скорость и/или состав подвижной фазы до достижения пригодности хроматографической системы.

Температура колонки: 70°C

Подвижная фаза: фосфатный буфер рН 2,0 : ацетонитрил =17:8 (V/V)

.Перед использованием фильтруют подвижную фазу через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют ее (с помощью ультразвука или гелия).

Скорость: около 1,5 мл/мин

Обнаружение: УФ, длина волны 215 нм.

Растворы для ВЭЖХ измерений

Стандартный раствор (SS)

Точно взвешивают 10 мг стандарта эналаприла малеата в 50 мл мерную колбу, растворяют в растворителе и доводят растворителем до метки (55: 0.2 мг эналаприла малеата/мл).

Испытуемый раствор (SaS)

Взвешивают 20 таблеток и определяют среднюю массу таблетки. Соответствующее количество целых таблеток (см. таблицу) помещают в подходящую мерную колбу, прибавляют 400 мл растворителя и воздействуют ультразвуком до полной распадаемости таблеток (в течение около 20 минут). Охлаждают до комнатной температуры, доводят растворителем до метки и хорошо перемешивают.

Центрифугируют часть суспензии при 3000 об/мин в течение 10 минут.

Прозрачный центрифугат является испытуемым раствором (SaS). При необходимости фильтруют центрифугат через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (SaS: 0,2 мг эналаприла малеата/мл).

Заявленное количество эналаприла малеата в таблетке (мг)	Объем мерной колбы (мл)	Количество таблеток, используемых для приготовления Испытуемого Раствора (SaS)	Добавленное количество растворителя (мл), используемое для приготовления Испытуемого раствора (SaS)
10	500	10	400
20	500	5	400

Процедура

Испытание пригодности хроматографической системы

В уравновешенную хроматографическую систему вводят 5 раз по 10 мкл стандартного раствора (SS). На хроматограмме этого раствора пик эналаприла следует за пиком малеиновой кислоты. На основании полученной хроматограммы вычисляют коэффициент разделения R между пиками малеиновой кислоты и эналаприла и относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика эналаприла для пяти повторных введений стандартного раствора (SS).

Хроматографическая система должна удовлетворять следующим критериям:

Критерий	Требование
Коэффициент разделения R	Не менее 5
Воспроизводимость, RSD % ($n=5$)	Не более 2,0 %

Примечание: Если тест *Количественный анализ эналаприла малеата* является продолжением теста *Однородность дозирования*, то проверку пригодности хроматографической системы не проводят.

Анализ

После проверки пригодности хроматографической системы выполняют калибровку для эналаприла малеата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят 10 мкл испытуемого раствора (SaS). Записывают хроматограмму и отмечают характеристики (время удерживания и площадь пика) эналаприла.

Идентификация

Время удерживания пика эналаприла на хроматограмме испытуемого раствора (SaS), полученной при количественном определении методом ВЭЖХ, соответствует времени удерживания пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора (SS), полученной в тех же условиях.

Содержание эналаприла малеата

Вычисляют содержание эналаприла малеата в % относительно заявленного количества.

Вычисление

$$\% \text{ эналаприла малеата} = \frac{C_{ss} \bullet ASaS \bullet a.m. \bullet V}{Ass \bullet WSa \bullet SA} \bullet 100$$

ASaS – площадь пика эналаприла на хроматограмме испытуемого р-ра (SaS)

Ass – среднее значение площади пика эналаприла на хроматограмме стандартного раствора (SS)

Css – концентрация эналаприла малеата в стандартном р-ре (SS), в мг/мл

V – объем мерной колбы, в мл

WSa – вес соответствующего количества целых таблеток, используемых для приготовления испытуемого раствора (SaS), в мг

SA – заявленное количество эналаприла малеата в одной таблетке, в мг

a.m. – средняя масса таблетки, в мг

100 – коэффициент пересчета, в %.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА

Испытание проводят по ГФ XI, вып.2, стр.193

НОРМА: Не более 1000 аэробных бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов в 1 г, при отсутствии *Escherichia coli*, *Salmonella*. Не более 100 других кишечных бактерий (Категория 3 г)

УПАКОВКА

Первичная упаковка Coldforming OPA/AL/PVC-AL *блистер по 10 таблеток*

Вторичная упаковка

2 блистера в картонной коробке вместе с инструкцией по применению.

Упаковка "Инбалк"

В транспортной картонной коробке 1000-2500 блистеров (блистер по 10 таблеток).

МАРКИРОВКА

Маркировка первичной упаковки (блистер)

Торговое название препарата, МНН, логотип производителя, «доза», номер серии и дата производства, срок годности.

Маркировка вторичной упаковки (картонная коробка)

Торговое название препарата, лекарственная форма, МНН, «доза», количество таблеток, состав, рег. номер, условия отпуска, название, адрес и товарный знак фирмы производителя, условия хранения, способ применения, предупредительная надпись, номер серии и дата производства, срок годности, штрих-код.

При упаковке на российском предприятии на картонной коробке дополни-

тельно указываются: название, торговый знак и адрес российского предприятия.

Маркировка упаковки «инбалк»

Шифр препарата, название препарата, доза, лекарственная форма, действующее вещество, упаковка, количество упаковок, номер серии, дата производства, срок годности, условия хранения, предупреждающие знаки, производитель, штрих-код.

СРОК ГОДНОСТИ *3 года*

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить при температуре до 25°C, в защищенном от влаги месте,

Примечание:

Показатель «средняя масса» включен по требованию Фармкомитета. Фирма гарантирует качество препарата по этому показателю.

630082, г. Новосибирск ул. **Д.Ковальчук 77**,
тел: 20-96-11, 25-04-82

КОНТРОЛЬНО-АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ОБЛАСТНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
 УЧРЕЖДЕНИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «ЦЕНТР ПО СЕРТИФИКАЦИИ И КОНТРОЛЮ
 КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ»

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ ИГК № 00088 от 10.10.2001 г.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА № А 02397 от **3 июля 2002 г.**

ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО Энап, таблетки по 20мг № 20

серия № 6208 от 03.2002 г.

Р.№013165/02-2001

общее количество: 36750 упаковок

предприятие-производитель **КРКА**, д.д., страна Словения
 упаковано ЗАО «**Вектор-Медика**», Россия, п. Кольцове Новосибирской области

заявитель 20.06.2002 ЗАО «**Вектор-Медика**»

нормативный документ НД 42-1395-01

СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНОГО ДОКУМЕНТА ПО ВСЕМ
 ПОКАЗАТЕЛЯМ КАЧЕСТВА ИЛИ НЕКОТОРЫМ (указать конкретно, по каким по-
 казателям):

№ п/ п	Наименование показателей ка- чества по норма- тивному доку- менту	Требования к качеству по нормативному документу	Результаты анализа
1.	Описание	Таблетки круглые, плоские, светло-оранжевого цвета со скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки	Таблетки круглые, плоские, светло-оранжевого цвета со скошенным краем и насечкой на одной стороне и вкраплениями белого цвета на поверхности и в массе таблетки.
2.	Средняя масса	0,170 г $\pm 5\%$	0,168 г
3.	Отклонения в	+ 7,5%	+2,7 % - 1,1 %
4.	Распадаемость	Не более 15 минут	4,5 минуты
5.	Подлинность	Д. выдерживать испытания	Выдерживает
6.	Родственные ве-	В сумме не более 5%	0,30%
7.	Растворимость	Не менее 80%	98,1%

8.	Однородность	85-115%	99,1-104,6%
9.	Количественное содержание	95,0-105,0% от заявленного количества	101,30%
10.	Микробиологическая чистота	Согласно требованиям ГФ Х1 вып. 2 и доп. 1, категория 3г	Соответствует
11.	Упаковка	2 блистера по 10 таблеток с инструкцией в картонной коробке	2 блистера по 10 таблеток с инструкцией в картонной коробке
12.	Маркировка	Д. соответствовать НД	Соответствует

Протокол анализа действителен только на одну серию

Провизор-аналитик _____ Иванова П.Б.

Заведующий контрольно-аналитической лабораторией _____ Усов В.Ю.

М.П.

Дата: 04.07.2003 12:10:26

Хроматограмма: Эналаприл

Дата запуска: 02.07.2002 15:29:28

Файл: 15290030.chw Дата записи: 02.07.2002 15:48:42

Метод: ENAP.mtw Дата записи: 27.04.2002 13:28:24

Оператор анализа: Антошкина

Номер анализа: 0

БУФЕР:

ПРОБА: Энап 20мг 6208; - к. опр.

Пробирка: 3 Объем: 5,0 цл

Разведение: 1,00

КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18

Размер: 2,0 x 75 mm

Номер: 0306

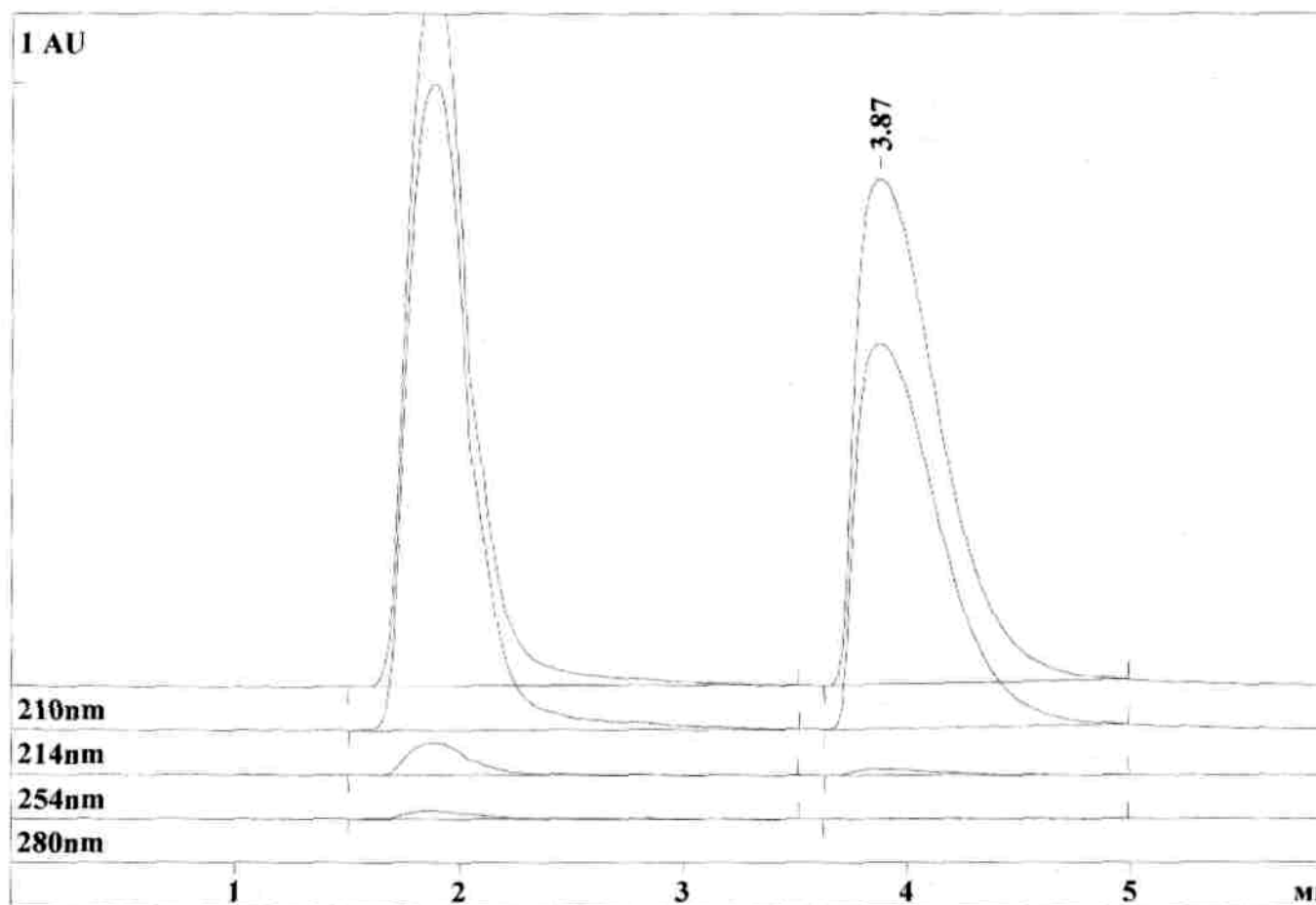
Зерно: 5,0 μ m

ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (32:68)

Скорость подачи: 100 μ l/min

Температура: 60,0 $^{\circ}$ C

Давление: 38,0 bar



Метод расчета: Заказной

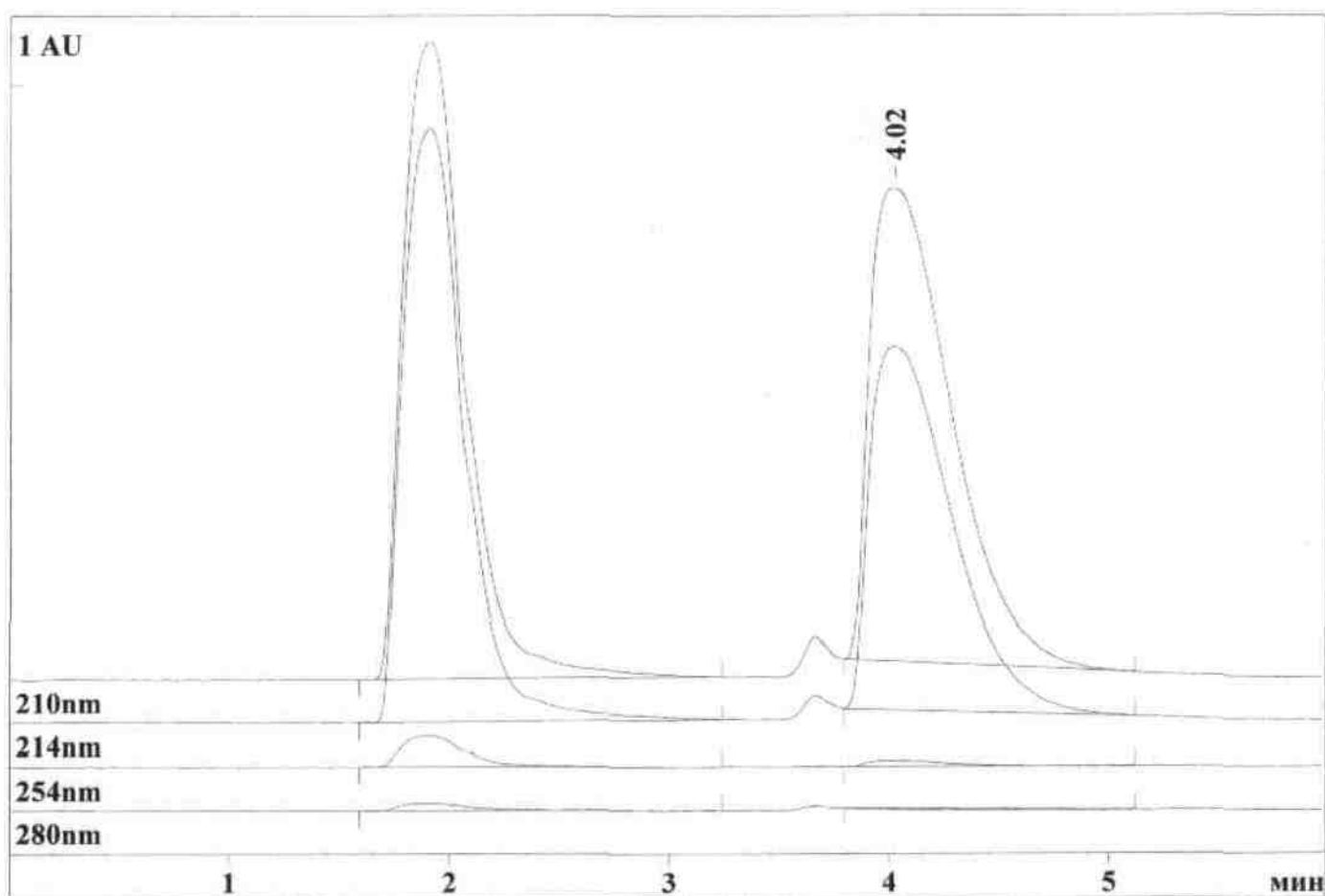
Стандарт: Нет Канал: 214 nm

Нормализация: 100,00

№	Удерж.	Высота	Площадь	210 nm	254 nm	280 nm	Название
1	188,28	0,83	26,762	1,080	0,050	0,015	малеиновая к-та
2	387,75	0,49	21,380	1,305	0,016	0,001	эналаприл
2	597,82	1,32	48,142				

Дата: 04.07.2003 12:10:41
 Хроматограмма: Эналаприл
 Дата запуска: 02.07.2002 12:57:24
 Файл: 12570010.chw Дата записи: 02.07.2002 13:45:12
 Метод: ENAP.mtw Дата записи: 27.04.2002 13:28:24
 Оператор анализа: Антошкина
 Номер анализа: 0

БУФЕР:
 ПРОБА: Эналаприл ст. 0,20 мг\мл
 Пробирка: 2
 Разведение: 1,00
 КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18
 Размер: 2,0 x 75 mm
 Номер: 0306
 Зерно: 5,0 μm
 ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (32:68)
 Скорость подачи: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$
 Температура: 60,0 $^{\circ}\text{C}$
 Давление: 38,0 bar

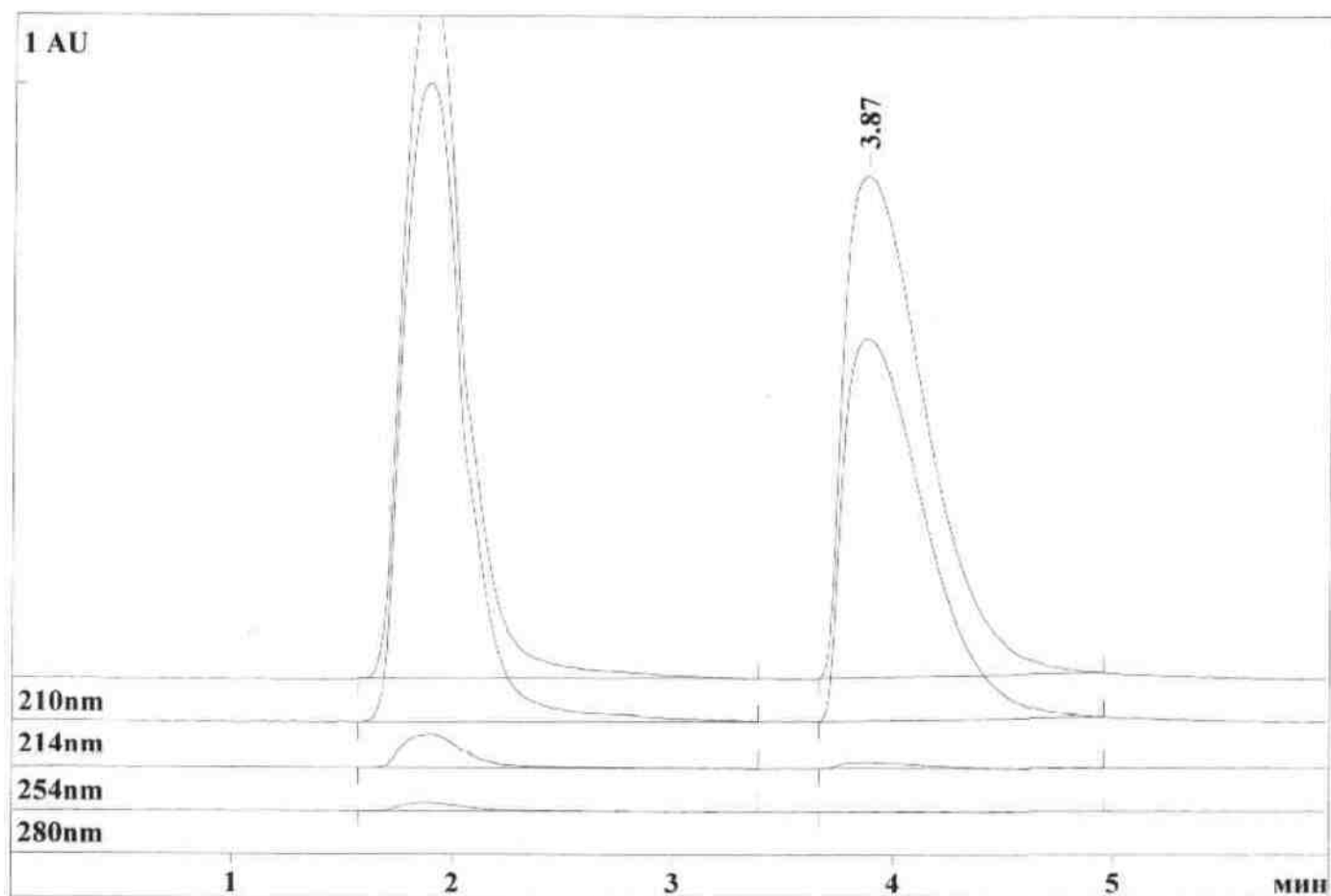


Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет Канал: 214 nm
 Нормализация: 100,00

№	Удерж.	Высота	Площадь	210 nm	254 nm	280 nm	Название
1	190,20	0,77	25,025	1,071	0,052	0,014	малеиновая к-та
2	402,12	0,47	20,521	1,293	0,014	0,006	эналаприл
2	597,92	1,25	45,545				

Дата: 04.07.2003 12:10:16
 Хроматограмма: Эналаприл
 Дата запуска: 02.07.2002 15:36:00
 Файл: 12570010.chw Дата записи: 02.07.2002 15:46:08
 Метод: ENAP.mtw Дата записи: 27.04.2002 13:28:24
 Оператор анализа: Антошкина
 Номер анализа: 0

БУФЕР:
 ПРОБА: Энап 20 мг 6208; 1т/100 - однородн
 Пробирка: 3
 Разведение: 1,00
 КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18
 Размер: 2,0 x 75 mm
 Номер: 0306
 Зерно: 5,0 μm
 ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (32:68)
 Скорость подачи: 100 $\mu\text{l}/\text{min}$
 Температура: 60,0 $^{\circ}\text{C}$
 Давление: 37,0 bar



Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет Канал: 214 nm
 Нормализация: 100,00

№	Удерж.	Высота	Площадь	210 nm	254 nm	280 nm	Название
1	188,14	0,83	26,596	1,083	0,051	0,013	малеиновая к-та
2	387,54	0,50	21,427	1,304	0,014	0,000	эналаприл
2	597,75	1,33	48,023				

Дата: 04.07.003 12:16:16
Хроматограмма: Эналаприл
Дата запуска: 02.07.2002 10:38:07
Файл: 10380100.chw Дата записи: 02.07.2002 11:05:54
Метод: ENAP.mtw Дата записи: 27.04.2002 09:44:10
Оператор анализа: Антошкина
Номер анализа: 0

БУФЕР:

ПРОБА: Энап 20 мг 6208; 1т/900 Вода – на раств.

Пробирка: 8

Разведение: 1,00

КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18

Размер: 2,0 x 75 mm

Номер: 0306

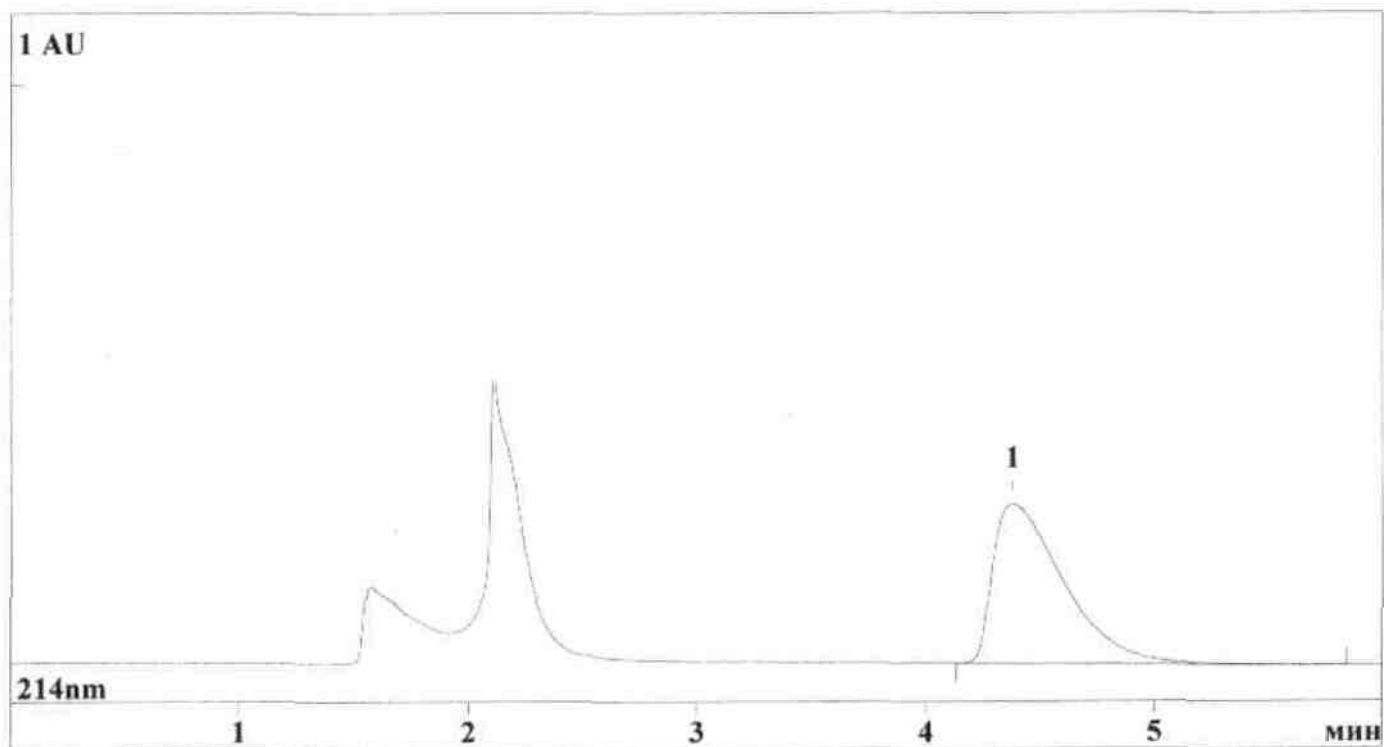
Зерно: 5,0 μ m

ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (32:68)

Скорость подачи: 100 μ l/min

Температура: 60,0 $^{\circ}$ C

Давление: 37,0 bar



Метод расчета: Заказной

Стандарт: Нет Канал: 214 nm

Нормализация: 100,00

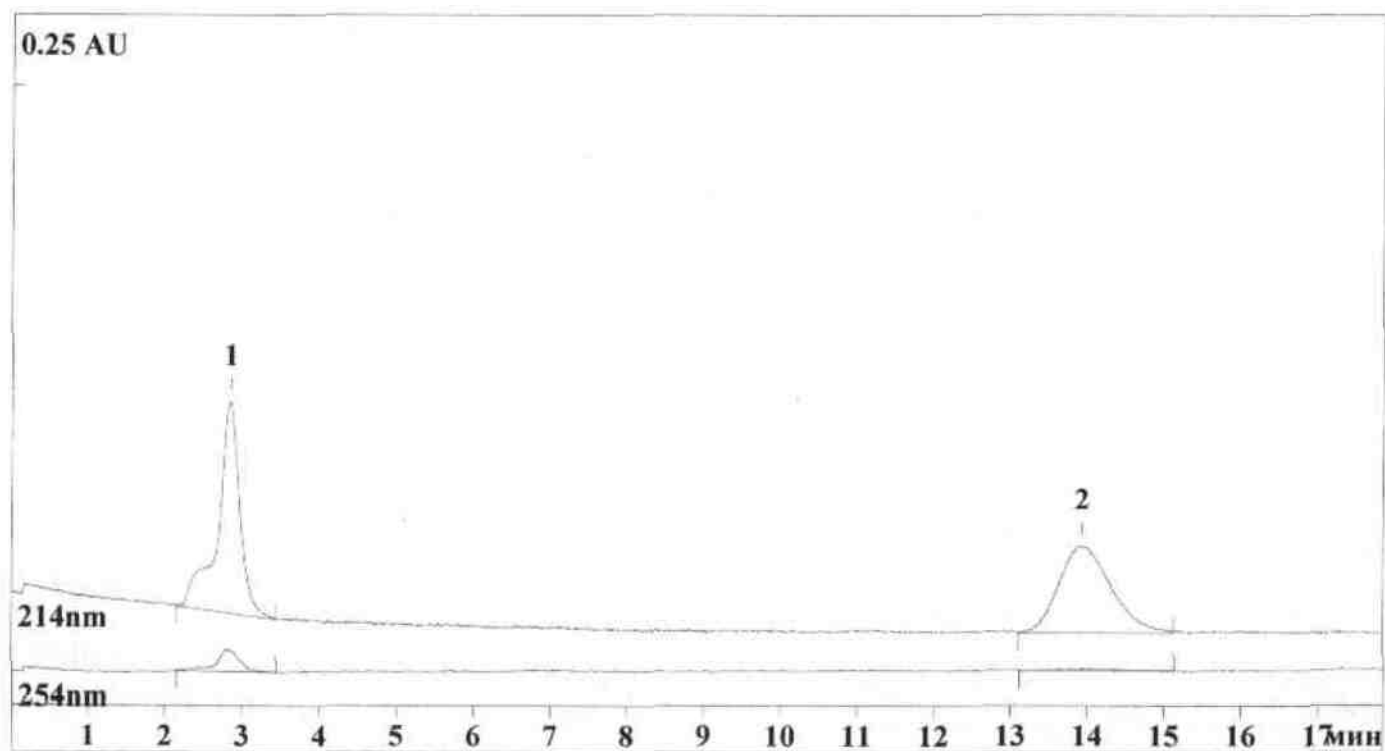
№	Удерж.	Высота	Площадь	Конц.	Название
1	437,79	0,26	9,277	0,021	эналаприл

Дата: 04.07.2003 12:12:30
 Хроматограмма: Эналаприл
 Дата запуска: 01.07.2002 10:37:23
 Файл: 12570010.chw Дата записи: 01.07.2002 12:20:02
 Метод: ENAP.mtw Дата записи: 30.04.2002 12:09:58
 Оператор анализа: Антошкина
 Номер анализа: 0

БУФЕР:
 ПРОБА: Эналаприл СТ. 0,010 мг/мл – на примеси
 Пробирка: 1
 Разведение: 1,00

КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18
 Размер: 2,0 x 75 mm
 Номер: 0306
 Зерно: 5,0 μm

ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (20:80)
 Скорость подачи: 80 $\mu\text{l/min}$
 Температура: 60,0 $^{\circ}\text{C}$
 Давление: 22,0 bar



Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет Канал: 214 nm
 Нормализация: 100,00

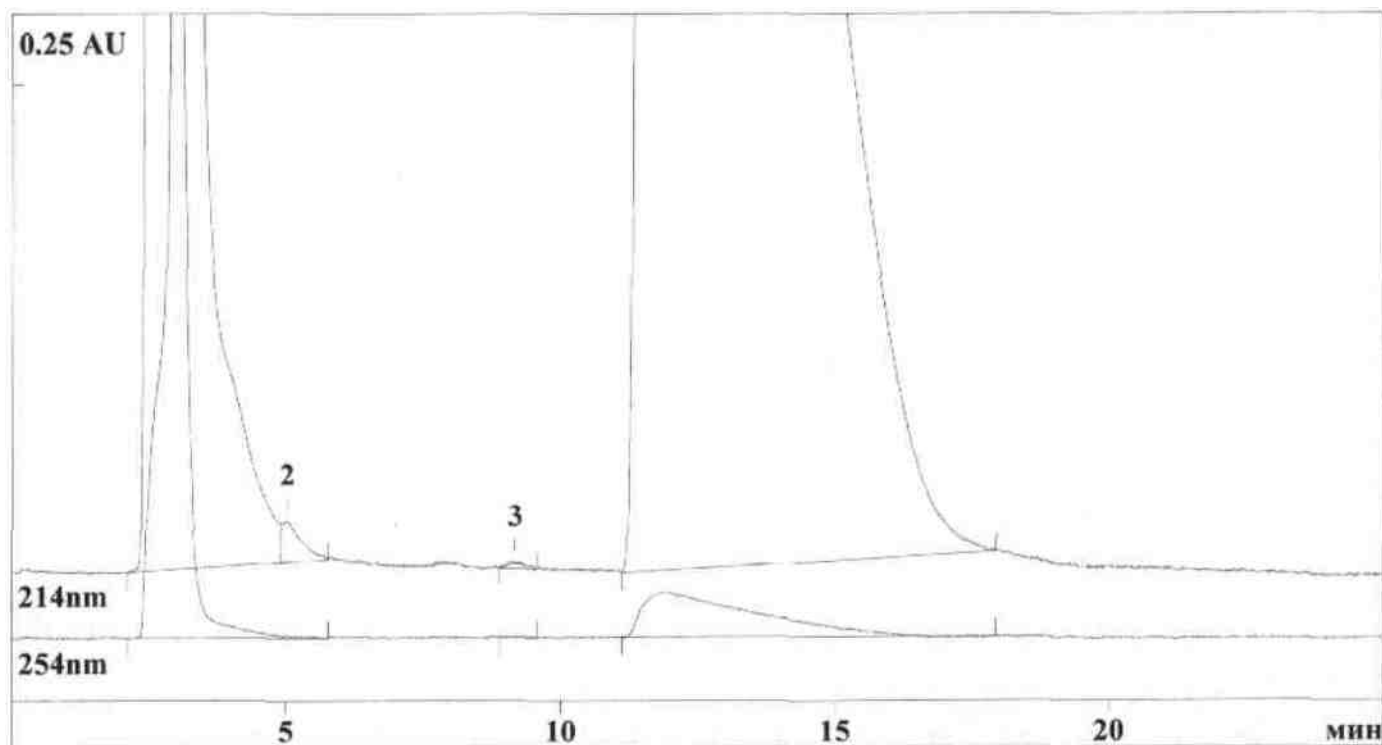
№	Удерж.	Высота	Площадь	Площадь	ТТ	Ассим.	Название
1	227,56	0,09	2,034	50,77	450	0,54	
2	1114,31	0,04	2,234	49,23	1978	1,48	эналаприл
2	1427,35	1,12	4,539	100,00	1214	1,01	

Дата: 04.07.2003 12:13:20
 Хроматограмма: Эналаприл
 Дата запуска: 01.07.2002 13:10:10
 Файл: 12570010.chw Дата записи: 22.08.2002 10:36:06
 Метод: ENAP.mtw Дата записи: 01.07.2002 12:30:32
 Оператор анализа: Антошкина
 Номер анализа: 0

БУФЕР:
 ПРОБА: Энап 20 мг 6208; 5т/100 мл – на примеси
 Пробирка: 7
 Разведение: 1,00

КОЛОНКА: Nucleosil 100 – 5C18
 Размер: 2,0 x 75 mm
 Номер: 0306
 Зерно: 5,0 μ m

ПОДВ.ФАЗА(A): АЦН:Буф pH 2,0 (20:80)
 Скорость подачи: 80 μ l/min
 Температура: 60,0 $^{\circ}$ C
 Давление: 24,0 bar



Метод расчета: Заказной
 Стандарт: Нет Канал: 214 nm
 Нормализация: 10000

№	Удерж.	Высота	Площадь	Площадь	Название
1	242,32	6,96	241,908	51,29	малеиновая к.
2	400,71	0,02	0,580	0,12	
3	732,68	0,00	0,084	0,02	
4	950,27	1,17	229,046	48,57	эналаприл
4	1998,41	8,15	471,618	100,00	