

6. ВЭЖХ В КОНТРОЛЕ ПРОИЗВОДСТВА И ФАРМАКОПЕЙНОМ АНАЛИЗЕ

6.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЭЖХ КАК МЕТОДА АНАЛИЗА

Приступая к использованию того или иного аналитического метода для решения конкретной задачи, необходимо уяснить, можно ли в принципе достичь избранным путем желаемой цели. В противном случае необоснованное применение метода может привести к принятию неверных решений в исследованиях и производстве. Результатом, помимо материальных и других потерь, явится компрометация аналитика либо даже метода в целом. Рассмотрим в связи с этим сильные и слабые стороны высокоэффективной жидкостной хроматографии. При их обсуждении будем исходить из ситуаций, характерных для различных этапов создания новых лекарственных средств, постадийного контроля производства, контроля качества продукции.

Почти все существующие методы анализа органических соединений непосредственно приложимы лишь к индивидуальным соединениям или простейшим смесям. Так, одновременное раздельное определение 2—3 соединений титриметрическими или спектрофотометрическими методами осуществимо лишь в редких случаях, когда свойства определяемых соединений в достаточной степени различаются. При разработке титриметрических и спектральных методик требуется немало труда, чтобы доказать специфичность метода, выявить условия и примеси, мешающие выполнению анализа. Хроматография, объединяющая в одном эксперименте разделение и анализ, почти лишена этих недостатков, и поэтому ее применение для анализа сложных смесей предпочтительно.

Немаловажным фактором при сравнительном анализе возможностей методов является их экспрессность. Если сравнивать продолжительность хроматографирования с продолжительностью других аналитических процедур, то можно прийти к выводу, что по экспрессности ВЭЖХ все еще уступает многим другим методам. И это действительно так, если анализу подлежит индивидуальное соединение и трудоемкостью подготовки пробы можно пренебречь. Однако, сравнивая возможности анализа сложных объектов, следует иметь в виду, что ВЭЖХ-метод наименее требователен к качеству подготовки пробы, а его универсальность позволяет в одном эксперименте определять сразу ряд соединений. Затраты времени на разработку новых методик с помощью ВЭЖХ также сравнительно невелики, что особенно важно в условиях исследовательских лабораторий, где часто приходится переключаться с одного типа анализа на другой. В зависимости от сложности проблемы трудоемкость разработки методики и продолжительность определения различны. Для разработки простой методики квалифицированному специалисту может потребоваться всего один день, для разработки более сложных — неделя или даже месяц. Продолжительность одного анализа на хроматографе чаще всего находится в пределах 3—15 мин.

Обсуждая воспроизводимость ВЭЖХ-анализа, следует учитывать, что она фактически складывается из двух частей. Первая из них — воспроизводимость методики анализа — связана с теми факторами, которые, независимо от воли оператора, могут влиять на результат

течением времени некоторые марки сорбентов могут быть сняты с производства и заменены новыми. С другой стороны, обнаруживаем, что k' толуола, полученные на разных сорбентах, хорошо коррелированы с k' бензола и значения относительных удерживаемых объемов более устойчивы. Следовательно, испытание подлинности, сформулированное как «удерживаемый объем испытываемого образца относительно бензола на октадецилсиликагеле равен $1,6 \pm 0,1$ », уже будет независимым от различий в свойствах октадецилсиликагелей разных марок.

Таблица 6.1

Сопоставление абсолютных и относительных величин удерживания

Сорбент	Коэффициент емкости		Относительное удерживание <u>толуол</u> бензол
	бензола	толуола	
Силасорб SPH C18	4,48	7,53	1,68
Силасорб С 18	2,31	3,36	1,57
Зорбакс ODS	3,50	5,64	1,61
Ультропак RP18	2,80	4,28	1,53
Ультра сфер ODS	3,63	5,88	1,62
Среднее значение	$3,34 \pm 0,83$ (24,9%)	$5,39 \pm 1,52$ (28,2%)	$1,60 \pm 0,06$ (3,5%)

Вторая составляющая воспроизводимости почти целиком определяется надежностью используемого оборудования и тщательностью выполнения всех операций при анализе. При исправном и высококачественном насосе, точном приготовлении подвижной фазы воспроизводимость времени удерживания на данной колонке составляет около $\pm 3\%$. Воспроизводимость высот и площадей пиков (часто определяющая точность количественного анализа) сильно зависит от качества используемого дозатора и навыков аналитика. При последовательном вводе одинаковых по объему проб разброс высот (площадей) пиков относительно среднего может быть около $\pm 2\%$.

Точность ВЭЖХ-анализа определяется качеством используемых для калибровки эталонных соединений, точностью подготовки пробы, правильным выбором способа количественной обработки, воспроизводимостью режима и результата хроматографирования. Корректный количественный анализ возможен только при наличии эталона определяемого вещества. Это, конечно, является ограничением метода ВЭЖХ, как, впрочем, и других физико-химических методов анализа. Потребители услуг хроматографистов-аналитиков часто задают вопрос: «Какова точность хроматографического анализа?» По нашему убеждению, на вопрос, поставленный таким образом, вообще нельзя дать ответа. Речь может идти только о точности той или иной хроматографической методики применительно к конкретным определяемым

требования к точности предъявляются при количественном определении основного соединения в лекарственном веществе. Здесь погрешность в 2% редко можно признать удовлетворительной. Наоборот, при определении примесей обычно достаточна лишь полуколичественная оценка, и относительная погрешность в 10% вполне допустима. Погрешность менее $\pm 3\%$ труднодостижима при современном уровне жидкостной хроматографии, поэтому данный метод нельзя рекомендовать для определения основного соединения в лекарственном веществе. С другой стороны, достичь точности, требуемой при анализе примесей, обычно нетрудно. В особо сложных случаях (например, при анализе микроколичеств в биообъектах) погрешность может достигать 20% и более. Однако в исследованиях такого рода с повышенной погрешностью можно мириться, к тому же для столь сложных смесей ВЭЖХ часто оказывается единственным специфическим методом.

Чувствительность ВЭЖХ определяется типом используемого детектора и химическим строением анализируемых веществ. Для соединений, в молекулах которых хромофоры отсутствуют, она часто оказывается недостаточной, и примеси такого рода нелегко зарегистрировать. К счастью, большинство лекарственных веществ и полупродуктов содержит хромофоры, и по отношению к таким соединениям чувствительность на 1—2 порядка превышает чувствительность спектрофотометрического анализа. Это обстоятельство может быть решающим при выборе метода анализа лекарственных форм высокоактивных препаратов, где содержание действующего вещества мало.

Таким образом, наряду со многими преимуществами высокоэффективной жидкостной хроматографии присущ ряд ограничений. Поэтому ее нельзя рассматривать как панацею при решении всех аналитических проблем в химии и промышленности лекарственных средств. Существует много задач, которые не хуже, а иногда даже лучше могут быть решены классическими либо другими физико-химическими методами. В табл. 6.2 даны рекомендации по использованию ВЭЖХ при решении типовых задач. Разумеется, эти рекомендации носят лишь самый общий, обзорный характер. В каждом конкретном случае, исходя из свойств веществ и стоящих задач, аналитик должен выбрать оптимальный метод.

Таблица 6.2

Классификация типов анализов и рекомендации по применению ВЭЖХ

Тип анализа	Рекомендации по применению ВЭЖХ*	Примечания
Определение целевого продукта в реакционных смесях	+ -	
Определение целевого и побочных продуктов в реакционных смесях	+ +	
Количественное определение основного соединения в технических	+ -	При содержании основного соединения до 95%

Испытание растворения	+ -	Применение особенно эффективно для форм с малым содержанием лекарственных веществ
Определение лекарственных веществ в биообъектах	+ +	

* «—» применение не рекомендуется.

«+ —» может применяться наряду с другими методами.

«+ +» обладает существенными преимуществами перед другими методами.

6.2. ПРИНЦИПЫ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

6.2.1. АНАЛИЗ ПО ВЕЛИЧИНАМ УДЕРЖИВАНИЯ

Этот вид анализа основан на том, что при постоянных условиях хроматографирования время удерживания данного вещества, а также все производные от него параметры являются постоянными величинами. В зависимости от наличия эталонных веществ, табличных значений параметров удерживания или детальных сведений о закономерностях поведения данного класса соединений можно избрать один из трех способов анализа.

Прямое сравнение величин удерживания осуществимо в том случае, когда в распоряжении исследователя имеется набор эталонов соединений, присутствие которых предполагается в данной смеси. В хроматограф вводят изучаемую смесь и затем последовательно все необходимые эталоны, измеряют времена удерживания. Различие времени удерживания эталона и идентифицируемого пика однозначно свидетельствует о неидентичности двух соединений, а совпадение указывает на то, что идентичность двух веществ вполне вероятна. Для того чтобы с большей надежностью убедиться в совпадении времен удерживания, эталон можно ввести в хроматограф вместе с изучаемой смесью. Количества идентифицируемого вещества и эталона при этом должны быть приблизительно равны. Если времена удерживания веществ действительно одинаковы, относительная высота идентифицируемого пика возрастет вдвое, а ширина (если колонка не перегружена образцом!) не изменится. Увеличение высоты пика менее чем в два раза и возрастание ширины свидетельствуют о неидентичности двух соединений. С помощью такого приема удастся уловить незначительные различия в величинах удерживания.

Предположим, что на колонке эффективностью 5000 теоретических тарелок время удерживания эталона 10 мин, а неизвестного пика — 10,2 мин. При обычной технике эксперимента такое различие недостоверно. Введя два вещества в колонку одновременно, получим суммарный пик. Если приведенное незначительное различие в удерживании

отношению к тем объектам, состав которых хорошо изучен. Лекарственные вещества, а также примеси в них можно отнести именно к такой категории. При воспроизведении методик анализа в этом случае фактически необходимо провести не идентификацию ранее неизвестных веществ, а лишь «привязать» измеренные величины удерживания к опубликованным величинам удерживания и структурам соединений. Например, детальное исследование примесей в форидоне (I) на Зорбаксе ODS показало, что пику с $\alpha = 0,19$ соответствует структура II, а пику с $\alpha=1,51$ — структура III (рис. 6.1):

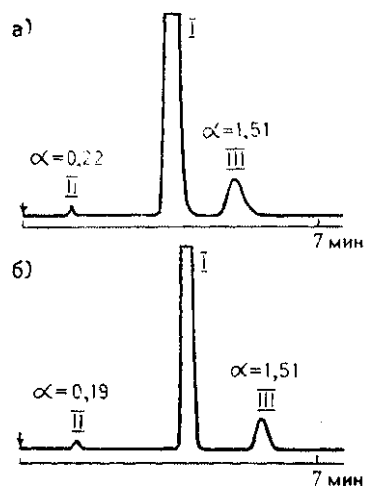
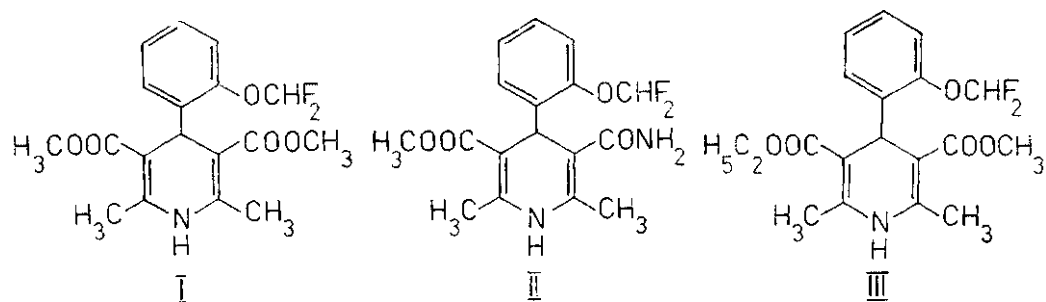


Рис. 6.1. Хроматограммы технического форидона. Условия анализа: колонка Зорбакс ODS (б), Силасорб С18 (а). Подвижная фаза — ацетонитрил—вода (1:1).

В дальнейшем, при замене Зорбакса ODS Силасорбом С18 в качестве материала для серийных анализов, были обнаружены примеси с $\alpha = 0,22$ и 1,51. Разумеется, в такой ситуации близость величин α к ранее наблюдавшимся можно считать достаточным доказательством при качественном анализе.

При достаточном опыте хроматографии и наличии обширных экспериментальных данных по удерживанию соединений рассматриваемого класса можно использовать так

концентрации 5% и выше, необходимое количество очищенных веществ можно получить на обычной аналитической или полупрепаративной колонке. При этом не требуется специальный препаративный хроматограф. Проблема выделения примесей, естественно, значительно сложнее, и в этом случае необходимо предварительное их концентрирование одним из доступных методов. Весьма полезной может оказаться информация, получаемая непосредственно при хроматографировании и детектировании поглощенного света в УФ- и видимой областях. Удобнее всего для этого пользоваться спектрофотометрами с диодной линейкой, позволяющими снять за один цикл разделения также спектры всех пиков. Однако эти приборы дороги и пока широко не распространены. Некоторые конструкции хроматографов предусматривают возможность остановки потока в момент выхода пика и непосредственной регистрации спектра с помощью детектора. При нескольких больших затратах труда и времени почти такую же информацию можно получить с помощью обычного спектро-фотометрического детектора.

На рис. 6.2 представлен УФ-спектр форидона, сопоставленный с относительной высотой пика этого препарата, при его детектировании на разных длинах волн. Эта зависимость также по существу является УФ-спектром. Для его получения в представленной форме необходимо было снять хроматограмму 10 раз, что потребовало около 2 ч. По нашему мнению, это не столь уж высокая цена за приведенный УФ-спектр. Далее, сопоставление хроматограмм смесей, снятых при различных длинах волн, позволяет судить о степени сходства строения изучаемых соединений. На рис. 6.3,а представлен ряд хроматограмм реакционной смеси. По мере увеличения длины волны детектирования высоты всех пиков изменяются симбатно и максимум поглощения наблюдается при 240 нм. Следовательно, система хромофоров и ауксохромов всех компонентов этой смеси одинакова.

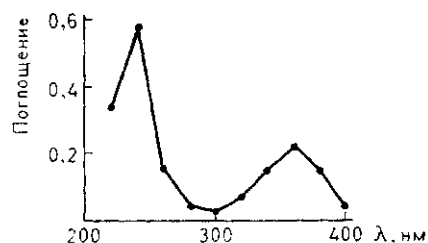
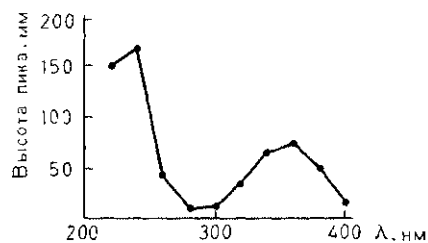


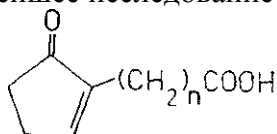
Рис. 6.2. Сопоставление УФ-спектров форидона, полученных на спектрофотометре СФ-26 (а) и спектрофотометрическом детекторе фирмы «Дюпон» (б).



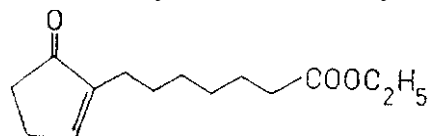
а)

б)

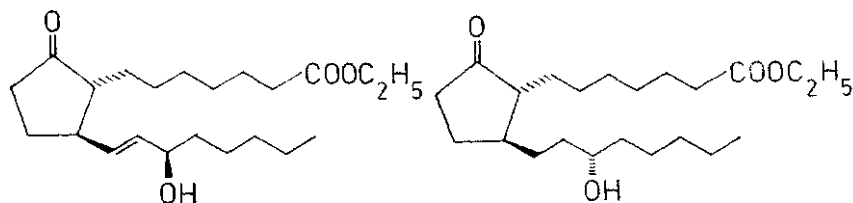
Дальнейшее исследование показало, что все они содержат общий структурный фрагмент



Наблюдаемый спектр отвечает цикlopентеноновой системе. В другом случае (рис. 6.3,б) обнаружено, что высоты пиков изменяются в различной степени, поэтому логично предположить разный характер ауксохромов и хромофоров. Действительно, с помощью других спектральных методов удалось показать, что пику, обозначенному звездочкой, отвечает структура



в то время как остальным двум соединениям — структуры



Согласно приведенным примерам, уже простейшие испытания непосредственно в хроматографе могут дать некоторое представление о качественном составе смеси и служить отправной точкой при более детальном изучении строения.

6.3. ПРИНЦИПЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Все приемы количественного анализа основаны на том, что сигнал детектора (т. е. высота либо площадь пика S) связан определенной функциональной зависимостью с массой вещества m , прошедшей через ячейку детектора:

$$S = f(m). \quad (6.1)$$

Параметры этой функции априори неизвестны ни для одного детектора и анализируемого вещества, поэтому, как правило, первым этапом количественного анализа служит калибровка, т. е. установление вида и параметров уравнения (6,1), отвечающих данному сорбату, условиям анализа, детектору и способу количественной обработки хроматограммы. Обычно конструкции детекторов и условия анализа подбираются таким образом, чтобы в максимально возможном диапазоне соблюдалась простейшая линейная зависимость

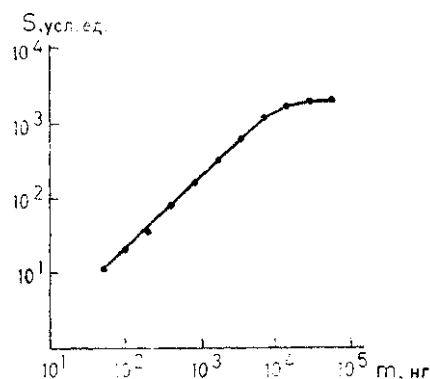


Рис. 6.4. Калибровочный график, Сорбат — форидон; условия анализа см. на рис, 6.1.

Перегрузка сорбента связана с переходом процесса на первых теоретических тарелках в область нелинейности изотермы сорбции. Ее можно наблюдать (для колонок с внутренним диаметром около 4 мм) при массе образца 20—100 мкг и выше, в зависимости от типа сорбента и состава, подвижной фазы. Обнаруживается такое явление легко: при перегрузке сорбента ширина пика увеличивается и (или) форма его ухудшается по сравнению с той, которая характерна для малых доз образца. Если обстоятельства все же вынуждают работать в области перегрузки сорбента, для количественной оценки допустимо применять площадь пика, но ни в коем случае не его высоту.

При отсутствии указанных осложнений выбор способа измерения пиков (т. е. в виде площадей или высот) диктуется требованиями конкретной методики анализа и наличием средств автоматизации. Все интеграторы позволяют измерять площади пиков, а некоторые модели по желанию оператора могут использоваться и для измерения высот. При работе с интегратором необходимо строго следить, правильно ли выбраны условия интегрирования, параметры, по которым это устройство отфильтровывает шумы и малые пики, обнаруживает начало и конец пика, устанавливает положение базовой линии. Выбор параметров интегрирования требует от оператора определенных навыков и времени. Вероятно, по этой причине интеграторы так и не вытеснили полностью самописцы и ручную обработку хроматограмм.

Устойчивость работы современных хроматографов, высокое качество колонок позволяют утверждать, что во многих случаях измерение высот пиков приводит к более точным результатам, чем измерение площадей. Это связано с тем, что исключается погрешность определения ширины пиков при ручной обработке и погрешность определения начала и конца пика — при автоматизированной.

В инструментальной хроматографии используют три основных метода количественной обработки хроматограмм. Хотя они достаточно подробно описаны в хроматографической литературе, тем не менее считаем целесообразным остановиться на некоторых аспектах, определяющих применимость и выбор того или иного варианта для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ситься с большой осторожностью. В то же время нередко складывается ситуация, в которой именно этот метод единственно приемлем. Воспроизводимость результатов, полученных методом нормализации, как правило, неплохая, поэтому он может быть использован тогда, когда необходимо в первую очередь сравнение ряда образцов, а правильность численных результатов не играет первостепенной роли. Подобного рода задачи иногда возникают при оптимизации тех или иных процессов, когда нецелесообразно проводить идентификацию всех примесей в изучаемых смесях и нарабатывать эталонные вещества для калибровки. В таких случаях применение метода нормализации вполне оправдано, позволяет достичь цели, поставленной перед данным анализом.

Метод абсолютной калибровки основан на использовании уравнения (6.1) или (6.2). Для его реализации необходим эталон определяемого вещества. Приготавливают растворы эталона различных концентраций, выбранных таким образом, чтобы они охватывали ожидаемый диапазон концентраций определяемого соединения. Снимают хроматограммы и строят график, подобный приведенному на рис. 6.4. Затем измеряют пик определяемого вещества и находят его концентрацию с помощью полученного графика. Разумеется, график может быть заменен соответствующим уравнением, параметры которого нетрудно найти известным способом. Этот метод требует строгой воспроизводимости объема образца, дозируемого в колонку. Если хроматограф снабжен качественным дозатором, относительная погрешность результата обычно не превышает 2—3%. Чаще всего, при работе в среднем диапазоне масс определяемых соединений (0,1 — 10 мкг), явления необратимой сорбции или нелинейности детектора не осложняют работу, калибровочный график представляет собой прямую, проходящую через начало координат. Тогда допустимо снизить трудоемкость анализа, используя всего один калибровочный раствор, по концентрации определяемого вещества не слишком отличающийся от испытуемого. Для достижения максимальной точности калибровку необходимо проверять не реже, чем через каждые 4—5 ч работы.

Метод внутреннего стандарта позволяет исключить погрешность ввода пробы и некоторые другие ошибки, связанные с подготовкой образца. При работе по этому методу необходимо выбрать постороннее соединение (внутренний стандарт), отсутствующее в анализируемой смеси и хорошо отделяющееся от всех пиков. Из этого соединения и определяемого вещества готовят серию искусственных калибровочных смесей. Концентрация определяемого вещества в таких смесях должна примерно соответствовать концентрации его в анализируемых смесях. В избранном для анализа режиме хроматографируют калибровочные смеси и измеряют площади пиков S_x (определяемый компонент) и $S_{ст}$ (внутренний стандарт).

По формуле

$$k_x = \frac{m_x S_{cm}}{S_x m_{cm}} \cdot 100 \quad (6.6)$$

где m_x и $m_{ст}$ — навески определяемого вещества и стандарта, находят калибровочный коэффициент k_x . В известном объеме смеси из точной навески от отношения $m_x/m_{ст}$ и подде-

пробы. Мы, однако, считаем, что в ВЭЖХ применение метода внутреннего стандарта оправдано лишь в одном случае — когда необходимо компенсировать погрешности, связанные с подготовкой пробы. Эти погрешности действительно велики при работе с биологическим материалом; при работе с реакционными смесями, полупродуктами, лекарственными веществами и формами они незначительны, поскольку образец не требует специальной подготовки и имеется в достаточном количестве. Для сравнительной оценки двух методов применительно к современным характеристикам ВЭЖХ можно использовать известные приемы суммирования парциальных погрешностей.

Для простоты примем, что количества определяемого вещества в анализируемом и калибровочном растворах близки и графики калибровки обоими методами проходят через начало координат. Тогда допустимо проводить калибровку по одному составу.

Методика анализа с помощью абсолютной калибровки включает измерения:

- массы эталона (P_K);
- массы анализируемого образца (P_A);
- объемов растворов при разбавлении эталона и анализируемого образца подвижной фазой (V_{PK}, V_{PA});
- объема проб эталона и анализируемого образца, вводимых в хроматограф (V_K, V_A);
- площадей пиков определяемого вещества на хромато-граммах калибровочной и анализируемой смесей (S_K, S_A).

Формула расчета содержания вещества X в процентах в пробе при этом приобретает вид

$$X = \frac{A \cdot K \cdot K \cdot P_A}{S_K \cdot P_A \cdot V_A \cdot V_{PK}} \cdot 100 \quad (6.8)$$

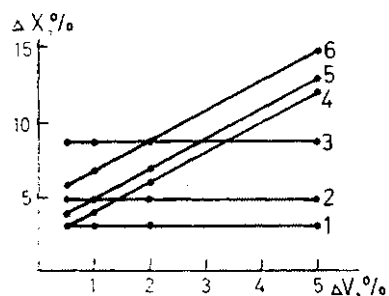


Рис. 6.5, Зависимость погрешности анализа ΔX от погрешностей определения объема вводимой пробы ΔV и площади пика ΔS . 1—5 — метод внутреннего стандарта, $\Delta S = 1, 2, 3\%$ соответственно; 4—6 — метод абсолютной калибровки, $\Delta S = 1, 2, 3\%$ соответственно.

При анализе методом внутреннего стандарта выполняются измерения:

- навески определяемого вещества и внутреннего стандарта в калибровочной смеси (P_{XK} и $P_{стК}$);
- навески исследуемого образца и внутреннего стандарта в анализируемой смеси ($P_{XA}, P_{стA}$);
- площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта в калибровочной смеси (S_K и $S_{стК}$);
- площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта в анализируемой смеси (S_A и $S_{стA}$).

6.4. АНАЛИЗ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Типичные реакционные смеси тонкого органического синтеза содержат значительные количества целевого продукта (20—90%) и, кроме того, некоторое число побочных продуктов или балластных соединений. Анализ такого рода смесей выполняется в двух случаях: 1) при синтетических исследованиях, отработке технологии; 2) в ходе производства с целью постадийного контроля.

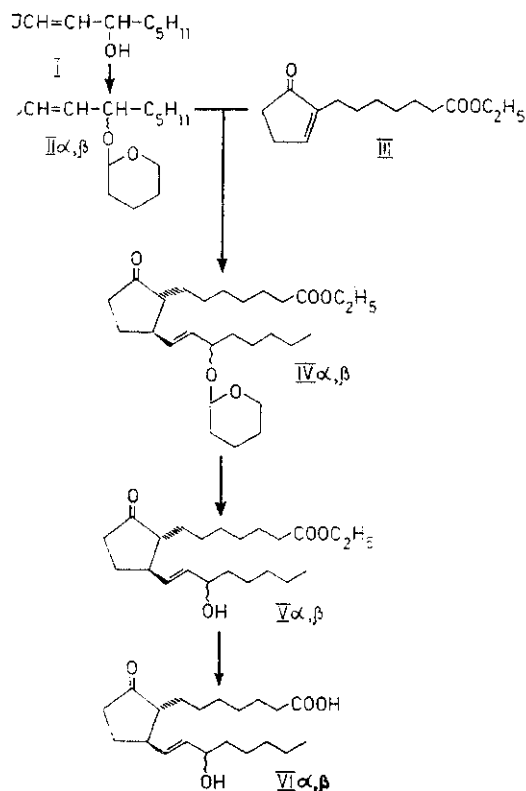


Рис. 6.6. Химическая схема получения 11-дезоксипростагландина E₁α (VI_α).

Как правило, особенно при контроле производства, задача анализа сводится к отделению целевого продукта от других компонентов смеси и его количественному определению. Элюирование из колонки всех компонентов смеси и разделение побочных продуктов требуются не всегда. Эталон целевого продукта для калибровки обычно доступен. Следовательно, имеется возможность применения метода абсолютной калибровки. Результаты анализа предназначены для использования внутри данного научного учреждения или промышленного предприятия, поэтому форма изложения методики и выдачи результатов анализа может быть произвольной.

Метод ВЭЖХ широко использован нами при отработке схемы полного синтеза и

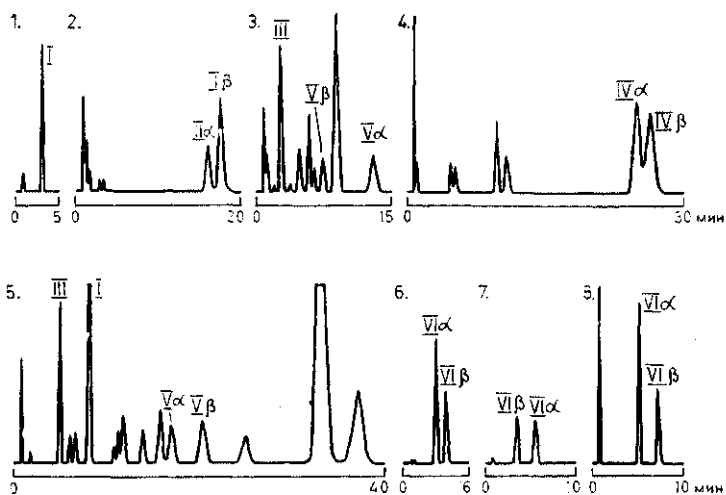


Рис. 6.7. Хроматограммы постадийного контроля синтеза 11-дезоксипростагландина $E_{1\alpha}$ и его лекарственных форм. Обозначения пиков соответствуют схеме на рис. 6.6.

Таблица 6.3

Условия ВЭЖХ при постадийном контроле синтеза 11-дезоксипростагландина $E_{1\alpha}$

Определяемые вещества	Сорбент	Подвижная фаза	Детектор	Номер хроматограмм на рис. 6.7
I	Микропак CN-10	Пропанол-2:гексан (0,8:99,2)	УФ, $\lambda=210$ нм	1
II	Зорбакс ODS	Ацетонитрил:вода (75:25)	УФ, $\lambda=210$ нм	2
III, $V_{\alpha,\beta}$	Силасорб 600	Пропанол-2:гексан (5:95)	УФ, $\lambda=210$ нм Рефрактометр	3
$IV_{\alpha,\beta}$	Зорбакс ODS	Ацетонитрил:вода (80:20)	УФ, $\lambda=210$ нм	4
III, $V_{\alpha,\beta}$	То же	Ацетонитрил:вода (55:45)	УФ, $\lambda=210$ нм	5
$VI_{\alpha,\beta}$	»	Ацетонитрил: вода:о-фосфорная кислота (55:44,5:0,5)	УФ, $\lambda=210$ нм	6
$VI_{\alpha,\beta}$ бром-фен ациловые эфиры	Силасорб 600	Пропанол-2:гексан (7:93)	УФ, $\lambda=254$ нм	7
	Зорбакс ODS	Ацетонитрил :вод а (75:25)	УФ, $\lambda=254$ нм	8

химик или технолог, для которого анализ предназначен, также должен быть проинформирован о реальной надежности получаемой информации. Хотя метод нормализации и не может быть рекомендован как общий прием, иногда характер анализируемого объекта позволяет получить вполне надежные результаты.

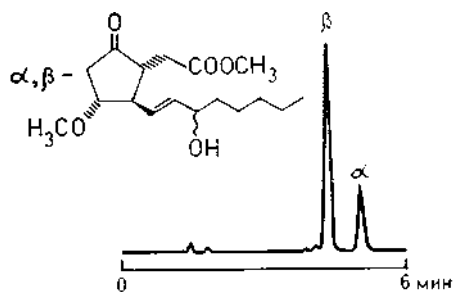


Рис. 6.8. Определение изомерного состава продукта. Колонка 4,6X250 мм. Сорбент — Зорбакс SIL. Подвижная фаза — пропа-нол-2—диоксан—гексан (8:5:87). Детектор — рефрактометр.

В качестве примера можно привести анализ изомерного состава одного из полупродуктов синтеза простагландина $F_{2\alpha}$ (рис. 6.8). Этот полупродукт очищен от всех химически чужеродных примесей и представляет собой смесь изомеров. Поэтому, когда режим хроматографирования найден, есть гарантия, что все компоненты смеси появятся на хроматограмме в виде пиков. Кроме того, их структурная близость позволяет предположить равную чувствительность детектора. Значит, есть основания использовать простейшую формулу метода нормализации площадей (уравнение (6.5)).

Для безэталоной количественной оценки примесей может быть использован также «метод условной калибровки». Эта разновидность метода абсолютной калибровки основана на предположении, что примеси имеют те же значения калибровочных коэффициентов (для УФ-детектора — коэффициентов экстинкции), что и основное вещество. Метод условной калибровки особенно удобен для определения примесей, содержание которых не превышает 1%. Он характеризуется хорошей воспроизводимостью, достоверность получаемых результатов не зависит от того, все ли компоненты пробы зарегистрированы детектором. Суть метода сводится к следующему. Приготавливают раствор анализируемого образца в подвижной фазе такой концентрации, чтобы основной пик на хроматограмме далеко выходил за пределы шкалы. Снимают хроматограмму и измеряют площади пиков примесей. Затем анализируемый раствор разбавляют подвижной фазой в n раз (n , например, может быть равно 50, 100, 200) и хроматографируют разбавленный раствор. Содержание примеси в процентах (X) находят, сравнивая площадь пика примеси на первой хроматограмме S_n с площадью пика основного вещества на хроматограмме разбавленного раствора S_K . Для этого используют формулу

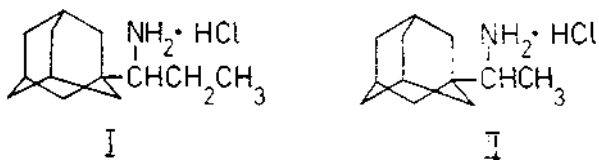
$$X = \frac{S_n \cdot 100}{S_K \cdot n} \quad (6.10)$$



6.6. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ПОДЛИННОСТИ

Определение подлинности лекарственных средств методом ВЭЖХ основано на сопоставлении хроматографической подвижности испытуемого образца с подвижностью эталона. В качестве эталона может использоваться стандарт данного лекарственного вещества либо другое лекарственное вещество. Данное испытание обеспечивает значительно большую достоверность, чем аналогичный эксперимент, выполняемый методом ТСХ. Статистический анализ значений R_f и k' в ТСХ и ВЭЖХ соответственно показывает, что в последнем случае воспроизводимость параметра идентификации на порядок лучше, чем в ТСХ.

Использование ВЭЖХ для доказательства подлинности особенно целесообразно, если необходимо идентифицировать один препарат из группы близкородственных, для которых не удается подобрать отличительные химические реакции. Так, например, адапромин (I) и ремантадин (II)



будучи гомологами, неразличимы по химическим свойствам. Обращенно-фазовая хроматография позволяет различить их и однозначно идентифицировать адапромин. Поскольку испытания подлинности применяются к готовой продукции и включаются в фармакопейные статьи, приведем в качестве примера методику испытания, изложенную в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи.

Подлинность. В устройство ввода жидкостного хроматографа вносят 0,005 мл 1%-ного раствора испытуемого образца в подвижной фазе. Записывают хроматограмму и измеряют время удерживания. Такие же операции выполняют с 1%-ным раствором ремантадина в подвижной фазе. Время удерживания адапромина, отнесенное к времени удерживания ремантадина, равно $1,30 \pm 0,05$.

Примечания. 1. Условия испытания. Для испытания применяют жидкостный хроматограф, снабженный рефрактометрическим детектором и колонкой, заполненной октадецилсиликагелем, эффективностью не менее 1000 теоретических тарелок. Линейная скорость подвижной фазы 0,2—0,4 см/с. Прибор выводят на рабочий режим в соответствии с инструкцией.

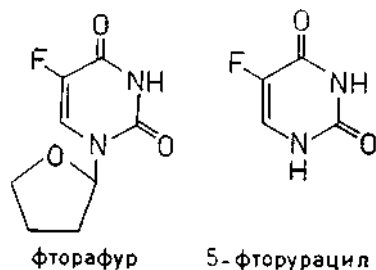
2. Приготовление подвижной фазы. В конической колбе вместимостью 1,0 л смешивают 2,72 г (0,01 моль) натриевой соли додецилсульфокислоты, 375 мл воды, 25 мл уксусной кислоты, 600 мл ацетонитрила. Полученный раствор фильтруют через плотный бумажный фильтр.

3. Приготовление 1%-ного раствора испытуемого образца. 50 мг испытуемого образца

характеристики. Далее, поскольку не регламентируется диаметр колонки, считаем более целесообразным указывать линейную скорость подвижной фазы. Именно этот параметр определяет скорость процесса. Анализ протекает быстро и без существенного снижения эффективности разделения при линейных скоростях до 0,4 см/с. Однако, если колонка имеет плохую проницаемость и (или) предельно допустимое давление в хроматографе не очень велико, эта скорость может быть недостижима, поэтому в качестве нижнего предела указываем 0,2 см/с.

6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Возможны несколько подходов к оценке чистоты лекарственных препаратов. В одних случаях анализ преследует цель контроля определенной примеси, существенно ухудшающей качество продукта: например, когда примесь токсична по сравнению с основным соединением. Ее содержание нормируется конкретным показателем, и именно эту примесь необходимо оценить количественно по возможности более строгим методом. В таких случаях наиболее приемлем метод абсолютной калибровки. Можно применять один калибровочный раствор, по концентрации отвечающий максимально допустимому содержанию примеси. В анализах такого рода коэффициент емкости определяемого соединения должен быть в пределах 1—3. Иногда в избранных для определения примеси условиях основное вещество не элюируется либо, наоборот, выходит из колонки очень быстро. Конечно, хроматограмма значительно нагляднее, если на ней видна не только примесь, но и основное вещество. Однако в данном случае никакие измерения основного пика не проводятся, поэтому его присутствие на хроматограмме совершенно необязательно. В качестве примера приведем методику определения 5-фторурацила во фторафуре:



Посторонние примеси. В устройство ввода жидкостного хроматографа вносят 0,050 мл 0,1%-ного раствора испытуемого образца в подвижной фазе. Записывают хроматограмму. Затем вводят 0,050 мл 0,0002%-ного калибровочного раствора 5-фторурацила в подвижной фазе, записывают хроматограмму, измеряют время удерживания и площадь пика 5-фторурацила. На хроматограмме испытуемого образца находят пик, соответствующий 5-

2. Приготовление подвижной фазы. В конической колбе смешивают 10 мл 95%-ного этилового спирта и 990 мл воды. Полученный раствор фильтруют через плотный бумажный фильтр.

3. Приготовление раствора испытуемого образца. Около 0,05 г (точная навеска) испытуемого образца переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл подвижной фазы, растворяют при нагревании на водяной бане до 60°C, доводят подвижной фазой до метки.

4. Приготовление калибровочного раствора. Около 0,05 г 5-фторурацила переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл прибавляют 40 мл подвижной фазы, растворяют при нагревании на водяной бане до 60°C, доводят подвижной фазой до метки. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят подвижной фазой до метки, тщательно перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят подвижной фазой до метки, перемешивают.

5. Регенерация колонки. В приведенных условиях фторафур удерживается колонкой очень сильно, что позволяет выполнить значительное число анализов 5-фторурацила. С течением времени в результате элюирования фторафура стабильность базовой линии может ухудшиться. В таком случае необходимо промыть колонку 20 объемами 40%-ного этилового спирта, после чего возвратиться к исходным условиям разделения.

Далеко не всегда имеется возможность и необходимость специфического определения какой-либо конкретной примеси. Часто достаточно определить суммарное содержание некоторой группы примесей. Испытания такого рода носят условный характер, однако достигают поставленной цели — оценки общей степени загрязненности образца. Например, при испытании методом ТСХ нередко критерием служит отсутствие пятен примесей либо их суммарная интенсивность. При этом условия испытания подбираются так, чтобы гарантировать, например, обнаружение 1 % наиболее вероятной примеси. Даже весьма невысокой точности метода ТСХ достаточно для решения задачи, поставленной таким образом. Недостатком ТСХ является невысокая эффективность, часто препятствующая определению близких по строению веществ. Высокое число теоретических тарелок, характерное для современных колонок, позволяет определять близкородственные примеси. Часто нецелесообразно или даже невозможно иметь полный набор эталонов для корректного количественного анализа. В таких случаях оптимальным способом количественной оценки может стать условная калибровка.

В качестве примера рассмотрим методику определения примесей изомеров 11-дезоксипростагландина E_{1a} в лекарственной форме, применяемой в ветеринарии (0,5%-ный инъекционный раствор).

Посторонние примеси. Хроматографируют 0,050 мл раствора стандартного образца препарата и 0,050 мл испытуемого образца. Измеряют время удерживания пика субстанции на хроматограмме раствора стандартного образца. На хроматограмме испытуемого образца

2. Приготовление подвижной фазы. В конической колбе смешивают 400 мл ацетонитрила, 598 мл воды, 2 мл о-фосфорной кислоты.

3. Приготовление раствора стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца субстанции растворяют в 100 мл подвижной фазы.

6.8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Высокие требования, предъявляемые к качеству современных лекарственных средств, нашли, в частности, свое отражение в том, что содержание основного вещества чаще всего нормируется на уровне не ниже 98%. Погрешность количественного ВЭЖХ-анализа обычно составляет 2—3%, и поэтому данный метод не позволяет достоверно различить продукты с истинным содержанием основного вещества, например, 97 и 99%. Следовательно, для количественного определения основного вещества в лекарственных субстанциях метод ВЭЖХ рекомендован быть не может.

Несколько иная ситуация возникает при анализе лекарственных форм. Содержание действующего вещества нормируется в более широких пределах, и точность ВЭЖХ уже позволяет сделать заключение о соответствии образца требованиям. Во многих случаях решающим обстоятельством при выборе метода анализа может стать высокая чувствительность ВЭЖХ. По мере прогресса лекарственной химии наблюдается тенденция к применению более активных препаратов в меньших дозировках, поэтому классические методы, используемые при количественном анализе субстанций, могут оказаться малопригодными для анализа лекарственных форм. Так, например, одна доза 11-дезоксипростагландина E_{1a} содержит 2,5 мг активного начала, и для однократного определения его титриметрическим методом пришлось бы израсходовать 20 доз, не говоря уже о дополнительных трудностях при подготовке к анализу. Совершенно нереальна в этом случае и оценка однородности дозирования. Именно на лекарственных формах такого типа преимущества ВЭЖХ проявляются наиболее ярко. Появляется даже возможность в одном эксперименте испытать однородность дозирования и количественное содержание. Примерная форма раздела фармакопейной статьи приводится ниже.

Количественное определение и однородность дозирования.

Для анализа используют 10 ампул препарата. Ампулы вскрывают, в каждую вводят по 5,0 мл подвижной фазы и перемешивают содержимое стеклянными капиллярами. В дозатор жидкостного хроматографа последовательно вводят по 0,05 мл раствора из каждой ампулы. На десяти полученных хромато-граммах измеряют площади пиков. Снимают хроматограмму 0,05 мл раствора стандартного образца, измеряют площадь пика. Содержание субстанции в каждой из ампул в граммах (X) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{H_x \cdot b \cdot 0,05}{H_s}, \quad (6.13)$$

6.9. ДРУГИЕ ТИПЫ АНАЛИЗОВ

Универсальность ВЭЖХ делает этот метод незаменимым не только в контроле производства и качества продукции, но в первую очередь на ранних стадиях разработки новых лекарственных средств. Можно утверждать, что своевременное привлечение ВЭЖХ помогает уяснить многие аспекты поведения изучаемых веществ и потому способствует как повышению качества, так и ускорению темпов научно-технических разработок. Ниже рассмотрен ряд задач,

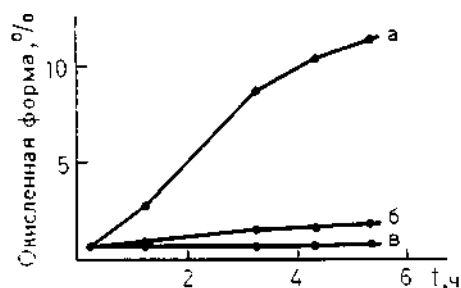
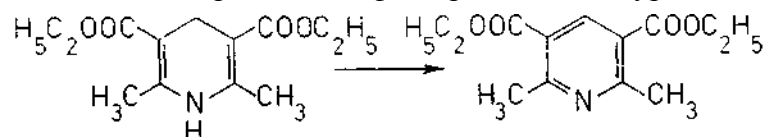


Рис. 6.10. Накопление окисленной формы диэтона в образце, растворенном в подвижной фазе, хранящемся во флаконе из бесцветного стекла (а), оранжевого стекла (б) и в темном помещении (в).

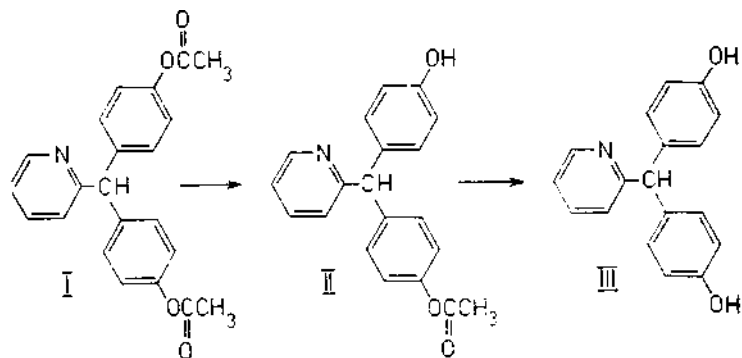
Устойчивость диэтона к окислению. Диэтон способен окисляться или дегидрироваться под воздействием различных факторов согласно уравнению



Селективное определение окисленной формы (хотя бы полуколичественное) осложнено тем, что в условиях тонкослойной хроматографии препарат претерпевает аналогичные превращения; спектрофотометрически диэтон и его окисленная форма различимы с трудом. Многие растворители сами по себе способны катализировать процесс. В то же время ВЭЖХ-разделение диэтона и окисленной формы осуществимо без труда (см. рис. 6.9). Для дальнейших исследований препарата надлежало выяснить, в частности, как влияют условия хранения раствора на содержание окисленной формы. Эксперимент выполнялся непосредственно в растворе подвижной фазы, помещенном во флаконы из бесцветного и оранжевого стекла, находившиеся на свету, а также во флаконы из оранжевого стекла, находившиеся в темноте. На рис. 6.10 приведены данные, полученные с помощью ВЭЖХ в реальном масштабе времени, т. е. в течение всего нескольких часов. Опыты показали, что растворы диэтона требуют особо деликатного обращения.

Изомеризация 11-дезоксипростагландина E_{1a} . В экспериментах по изучению стабильности лекарственных форм 11-дезоксипростагландина E_{1a} с целью придания препарату желаемой растворимости использовались щелочные буферные растворы. Было обнаружено, что

жидкостная хроматография. Оказалось, что бисако-дил (I) как таковой почти не переходит в раствор гидрокарбоната натрия, а в растворе присутствуют почти исключительно продукты его щелочного гидролиза II, III:



Соответствующая хроматограмма приведена на рис. 6.12, а кривые перехода соединений I—III в раствор — на рис. 6.13. Таким образом, в данном случае применение ВЭЖХ позволило пролить свет на начальные стадии метаболизма.

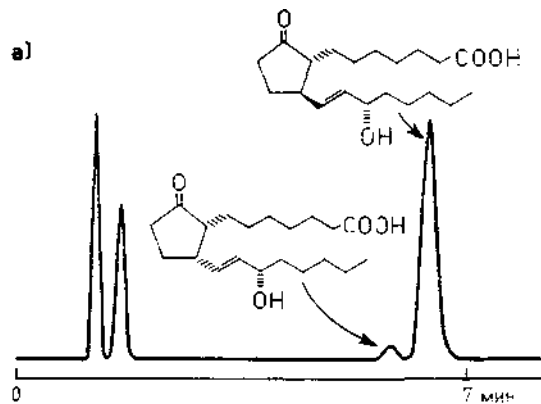


Рис. 6.11. Лпофильный 11-дезоксипростагландин E_{1a} . а — хроматограмма. Колонка 4,6x150 мм, сорбент — Зорбакс ODS. Подвижная фаза — ацетонитрил—вода—о-фосфорная кислота (50:49,8:0,2). Детектор — УФ-спектрофотометр, $\lambda = 210$ нм; б — равновесное содержание 8,12-цис-изомера в лекарственной форме в зависимости от pH среды.

