

ELSICO • SINCE '87



2014

Термины и сокращения в ВЭЖХ

параметры разделения

критерии пригодности

валидационные характеристики

www.chromforum.ru
www.shop.hplc.ru



Список терминов и сокращений

НФ – **stationary phase**, неподвижная фаза: конкретный тип пористого (в т.ч. адсорбционного) материала, которым заполнена колонка.

Материал, применяемый для разделения, называют «неподвижной фазой» в наиболее общем смысле. Термин «адсорбент» менее универсален: неподвижная хроматографическая фаза не обязательно должна проявлять адсорбционные свойства (см. «Эксклюзионные режимы»).

ПФ – **mobile phase**, подвижная фаза: элюент. Эти два термина эквивалентны.

Типоразмер – **column dimensions**, габариты хроматографической колонки: длина, внутренний диаметр, а также зернение частиц применяемого адсорбента.

Удерживание (строго говоря, **фактор удерживания**) – **retention (retention factor)**, параметр в адсорбционных хроматографических режимах, характеризующий величину взаимодействия вещества с адсорбентом, а также, соответственно, и скорость продвижения зоны вещества вдоль колонки.

Чем выше удерживание вещества, тем больше время удерживания его пика на хроматограмме.

Фактор удерживания обозначается **k'** – это безразмерный параметр. Он определяется из хроматограммы как число отрезков по t_0 , которые надо отложить от t_0 до максимума данного пика:

$$k' = (t'R - t_0)/t_0.$$

Диапазон оптимальных удерживаний зависит от типоразмера колонки. Чем короче колонка, тем большее удерживание требуется для достижения оптимальных условий ее работы. В среднем этот диапазон соответствует $2 < k' < 10$.

Хроматографическая система – **chromatographic system**, как правило, этим термином обозначают набор параметров, определяющих ее физико-химические свойства. К этим параметрам относятся: неподвижная фаза, подвижная фаза и температура.

Селективность – **selectivity**, в общем смысле: способность хроматографической системы разделять два вещества. Для конкретной пары пиков вычисляется как отношение факторов удерживания: $\alpha = k'_1/k'_2$.

Нередко эту величину называют «относительным временем удерживания», что неверно. В хроматографии нет такого термина.

Эффективность – **efficiency**, термин с большим числом значений, в общем смысле: безразмерный параметр, характеризующий размывание зоны вещества в колонке. Обозначается **N**. Нередко эффективности приписывают формальную единицу «количество теоретических тарелок», «т.т.», «тыс. т.т.» и тому подобное, что лишено какого-либо физического смысла.

Зона вещества может размываться как внутри колонки, так и вне ее (экстраколоночное размывание). Размывание внутри колонки определяется множеством факторов, в том числе качеством упаковки колонки при ее производстве.

Эффективность колонки, измеренная таким образом, чтобы выявить качество ее упаковки, часто называют паспортной эффективностью. Сам процесс измерения называют **тестированием колонки**.

Параметр «эффективность колонки» часто критикуют за его формализм, что чревато возможностью манипулирования им в коммерческих целях. На практике следует постоянно помнить, что разрешение пропорционально всего лишь квадратному корню эффективности, что, к тому же, выполняется лишь в области высоких удерживаний.

Пиковая плотность – **peak capacity**, термин, предложенный как альтернатива эффективности: число пиков, которые можно расставить на хроматограмме один за другим с разрешением 1 от удерживания,

Список терминов и сокращений

равного 0, до данного.

Пиковая плотность пропорциональна квадратному корню эффективности и логарифму удерживания. Таким образом, высокая удельная пиковая плотность достижима только в области низких удерживаний. Однако, короткие колонки в данной области не успевают набрать паспортную эффективность. Соответственно, для достижения высокой пиковой плотности применяют длинные колонки.

Коэффициент асимметрии (на 1/10 высоты) – **asymmetry factor**, отношение правой полуширины пика к левой на 1/10 высоты пика. Коэффициент асимметрии (на 1/100 высоты) – **tailing factor**, отношение правой полуширины пика к левой на 1/100 высоты пика.

Разрешение – **resolution**, параметр, количественно выражающий степень разделения двух пиков. Вычисляется как отношение расстояния между их максимумами к сумме половин ширин на уровне базовой линии: $R = 2 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)$. При этом ширина пика определяется как длина отрезка, отсекаемого на базовой линии двумя касательными к пику, проведенными на половине его высоты. При $R = 1$ разделение двух пиков таково, что перекрываются около 2% их площади; при $R = 1.2$ перекрывание составляет всего порядка 0.3%.

Одной из основных формул хроматографии является зависимость разрешения от селективности, эффективности и удерживания: $R = \frac{1}{4} \cdot (\alpha - 1) / \alpha \cdot \sqrt{N} \cdot k' / (k' + 1)$.

Наиболее существенный недостаток параметра R состоит в том, что приведенный способ его расчета применим только к идеально симметричным пикам, что на практике является нечастым случаем. Для асимметричных пиков классический параметр разрешения дает завышенные результаты, поэтому не пригоден в качестве критерия разделения.

Для асимметричных пиков методику определения ширины пика необходимо изменить: например, строить касательные не на половине высоты, а на 1/10 высоты пика для умеренно асимметричных, или на 1/100 высоты пика для сильно асимметричных пиков. Тогда формула для расчета разрешения примет вид: $R' = 2 \cdot (c_2 - c_1) / (w_1 + w_2)$, где w_1, w_2 – вычисленные по новому способу ширины пиков, а c_2 и c_1 – середины отрезков, отсекаемых касательными на базовой линии.

Критическая пара (пиков) – **critical pair**, два пика на хроматограмме с наименьшим разрешением; хотя бы один пик должен является пиком целевого соединения, что и обуславливает обязательность разделения критической пары.

Хроматографический режим – **chromatographic mode**, совокупность хроматографических систем, для которых селективность разделения для данной выборки соединений хорошо коррелирует с каким-либо физико-химическим свойством, измеренным или рассчитанным не из хроматографических данных.

Адсорбционные режимы – **adsorption modes**, хроматографические режимы, в которых динамическое разделение веществ обусловлено их адсорбционным удерживанием пористой неподвижной фазой (адсорбентом).

К адсорбционным режимам можно отнести: **обращенно-фазовый (RP)**, **нормально-фазовый (NP)**, **ионный (IC, или IEC)**, **с переносом заряда (CT)**, **лигандообменный (LEX)**.

Разделение в адсорбционном режиме начинается в нулевое время (время элюирования неудерживаемого компонента); максимальное время хроматографирования не ограничено.

Эксклюзионные режимы – **exclusion modes**, хроматографические режимы, в которых динамическое разделение веществ обусловлено их ограниченным проникновением в поры неподвижной фазы.

К эксклюзионным режимам можно отнести: **эксклюзионный по размеру (SEC, или GPC)**, а также

Список терминов и сокращений

ион-экслюзионный (IEX).

В экслюзионных режимах удержание веществ неподвижной фазой отсутствует. Соответственно, взаимодействие вещества с НФ либо отсутствует (экслюзионный режим по размеру), либо взаимодействие носит характер отталкивания (ион-экслюзионный режим).

Разделение в экслюзионном режиме начинается в момент времени, соответствующий объему элюента между гранул НФ, а заканчивается в нулевое время (время элюирования неудерживаемого компонента, который проникает во все поры материала).

Вид хроматографии – совокупность хроматографических систем, для которых один из хроматографических режимов является доминирующим.

Смешанные (двойные, тройные) **режимы** – **mixed modes**, совокупность хроматографических систем, для которых нельзя выделить один доминирующий хроматографический режим.

Гибкость – **flexibility**, возможность варьировать селективность хроматографической системы в широком диапазоне путем изменения состава подвижной фазы и/или марки неподвижной фазы.

Гибкие хроматографические системы удобны, в первую очередь, при разработке условий разделения, поскольку селективность разделения можно тонко настраивать (**system fine tuning**), принципиально не меняя технического решения.

Гибкие хроматографические системы неудобны тем, что хуже воспроизводятся, т.е. валидируются (см. “Робастность”).

При разработке методик, как правило, предпочитают начинать с опробирования негибких систем, и переходят к гибким только в том случае, если негибкие не способны обеспечить требуемой селективности разделения.

Наиболее гибкими являются системы, работающие в смешанных хроматографических режимах.

Валидация – **validation**, процедура проверки методики на соответствие заявленным характеристикам, которые называют валидационными.

Объем исследований, проводимых в рамках валидации, зависит от конкретной ситуации. Наиболее широкие исследования проводятся при разработке методики.

По упрощенной схеме проводится валидация аттестованной методики при ее внедрении в конкретной лаборатории. Подобные упрощенные схемы валидации могут быть приведены в самой методике в качестве рекомендаций разработчика.

Валидационные характеристики – **validation characteristics**, ряд декларируемых количественных показателей, характеризующих данную методику.

Валидационные характеристики можно условно разделить на две группы. К первой группе относятся основные метрологические характеристики: рабочий диапазон, прецизионность, правильность, предел(ы) определения (обнаружения).

Ко второй группе относятся характеристики самого хроматографического определения: специфичность и робастность.

В частных случаях валидироваться могут и другие специфические характеристики; к примеру, в фармацевтике валидация методики может включать тесты на растворимость.

Специфичность – **specificity**, возможность успешно провести определение по данной методике при наличии в пробе мешающих веществ (контаминантов): компонентов матрицы, примесей, продуктов деградации.

Список терминов и сокращений

Специфичность методики можно увеличить тремя способами. Первый способ состоит в выборе специфичного метода детектирования (который реагирует на целевые соединения, но не реагирует на вероятные контаминанты). Второй способ состоит в выборе специфичного режима разделения (в котором, к примеру, целевые соединения удерживаются, а вероятные контаминанты – нет). Третий способ состоит в применении двух или более дублирующих друг друга условий разделения с различающейся селективностью.

Повышенные требования к специфичности предъявляются к анализаторам на базе жидкостных хроматографов. Наиболее специфичные методики принято рекомендовать как арбитражные.

Робастность – **robustness**, устойчивость хроматографической системы, ее способность демонстрировать неизменные удерживания и селективности при воспроизведении методики разделения в различных лабораториях или/и в разное время.

В большинстве случаев робастность оценивают путем измерения хроматографических характеристик: удерживания, селективности – при небольшом варьировании параметров хроматографической системы. Проблема состоит в том, что в ряде случаев бывает нелегко выделить именно те параметры, которые критично влияют на робастность, или корректно измерить реальную степень оказываемого ими влияния.

Например, для ион-парных обращенно-фазовых систем оценка робастности путем проведения серии экспериментов длительностью в нескольких часов будет некорректной, поскольку адсорбционное равновесие в таких системах устанавливается в течение нескольких дней.

Критерии пригодности хроматографической системы – **suitability**, набор критериев, по которому можно судить о том, что данное хроматографическое разделение воспроизведено корректно, и не может стать причиной возможного неуспешного прохождения процедуры валидации.

Основным и, фактически, единственным необходимым критерием пригодности хроматографической системы является разрешение критических пар на хроматограмме. Если критические пары разделяются выше некоторого заданного значения, то разделение является пригодным, и никакие другие критерии для подтверждения пригодности больше не требуются.

Некоторая проблема применения разрешения R как критерия пригодности заключается в том, что “классический” расчет разрешения основан на предположении об идеальной симметрии пиков, т.е. для асимметричных пиков он не работает. Выход заключается в том, чтобы применять иную, более корректную методику расчета разрешения (см. “Разрешение”).

Нередко в качестве критериев пригодности приводят такие характеристики как эффективность, удерживание, коэффициент асимметрии. В этом нет никакого смысла, поскольку корректно определенный параметр разрешения включает в себя все эти факторы.

Критерии пригодности хроматографической системы – **quantification**, набор критериев, по которому можно судить о том, что относительная погрешность определения площади пика целевого соединения находится в заданных рамках.

Для веществ, определяемых на уровне следовых концентраций, значительную погрешность при измерении площади пика может вносить шум. Для таких соединений принято задавать некоторое наименьшее значение отношения высоты пика к высоте шума, которое называется **отношением сигнал/шум** (**signal-to-noise ratio**), и обозначается **S/N**.

Для основных веществ подобным критерием служит относительное среднее квадратическое отклонение, рассчитанное из серии измерений площади пика при вводе в хроматограф стандартного раствора определенной концентрации.



Tel.: + 7 495 210 1888
E-mail: mail@hplc.ru

ELSICO • SINCE '87



ЭЛСИКО хроматографическая компания
решения для жидкостной хроматографии с 1987 года

105082, Москва, ул. Бакунинская, д. 69, стр.1, офис 25.
Тел.: + 7(495) 210-1888, 518-0407, факс: + 7(499) 991-0220. E-mail: mail@hplc.ru.
Web: www.hplc.ru, www.chromforum.ru, www.shop.hplc.ru.

www.chromforum.ru
www.nanospher.com