

Assessment of the Relative Retention Times Variability Using Chromatographic Columns with Grafted C18 Groups

I.V. Kudris^{1,3}, A.Yu. Kulikov^{2*}

¹ The State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine, Ushinskogo Str., 40, Kiev, Ukraine, 03151

² Laboratory of Pharmacopoeial Analysis, Scientific and Expert Pharmacopoeial Centre, Astronomicheskaya street 33, 61085, Kharkov, Ukraine; *e-mail: kulikov@phukr.kharkov.ua

³ V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq. 4, 61022, Kharkiv, Ukraine

Received: June 12, 2013; Accepted: January 27, 2014

One of the ways is used for peaks identification in the chromatograms is relative retention time (RRT). However, in practice, the values of the relative retention times, which were received, often do not coincide with those prescribed in the literature, and identification, based on the RRT, may lead to incorrect peak as-signments. The main contribution on the different retention of compounds influences different chromatographic columns using.

In this study the chromatographic behavior of three model mixes was performed by using 11 different chromatographic columns with octadecylsilica sorbent (C18). Variability of the components relative retention times on the different columns was carried out. It is founded that high variability of the relative retention time values on different chromatographic columns do not allow to peaks identification based on RRT.

Keywords: relative retention time, variability, HPLC, octadecylsilica sorbent

Оценка вариабельности относительных времен удерживания при использовании хроматографических колонок с привитыми C18 группами

И.В. Кудрис^{1,3}, А.Ю. Куликов^{2*}

¹ ГП «Государственный экспертный центр МЗ Украины», ул. Ушинского, 40, Киев, 03151

² ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», *e-mail: kulikov@phukr.kharkov.ua
ул. Астрономическая, 33, г. Харьков, 61085, Украина

³ Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, г. Харьков 61077, Украина

Поступила: 12 июня 2013 г; Принята: 27 января 2014 г

Одним из способов идентификации пиков на хроматограмме является использование величин относительных времен удерживания (RRT). На практике, при воспроизведении методик, полученные значения относительных времен удерживания часто не совпадают со значениями, описанными в литературе. Основной вклад в различие удерживания веществ оказывает использование различных хроматографических колонок.

В данной работе проведено хроматографическое разделение трех модельных смесей на 11 хроматографических колонках заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами (C18). Проведен расчет вариабельности относительных времен удерживания компонентов модельных смесей на разных колонках. Установлено, что высокая вариабельность относительных времен удерживания, полученная на разных колонках, не позволяет проводить идентификацию веществ при воспроизведении методик анализа, используя величины относительных времен удерживания.

Ключевые слова: относительное время удерживания, вариабельность, ВЭЖХ, сорбент с привитыми октадецильными группами

В последние годы высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), благодаря развитию аппаратной базы и методических подходов, занимает лидирующую позицию среди инструментальных методов анализа по частоте применения в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности, токсикологических и фармакокинетических исследованиях. Хроматографические методы являются незаменимыми для качественного и количественного определения веществ как в многокомпонентных смесях, так и в сложных матрицах. Они позволяют провести как разделение компонентов смеси (отделить интересные компоненты от матрицы) так и провести их идентификацию и/или количественное опреде-

ление. Аналитический сигнал детектора в хроматографии регистрируется в виде хроматограммы, на которой хроматографические пики соответствуют определенным компонентам разделяемой смеси. Качественной характеристикой определяемого компонента служит время удерживания (t_r) хроматографического пика; оно также используется и для идентификации компонентов смеси посредством сравнения времен удерживания пиков на хроматограмме испытуемого образца со временами удерживания пиков стандартных веществ на хроматограммах раствора сравнения.

Зачастую в сложных матрицах идентификацию дополняют как спектральными характеристиками пика (так называемый ультрафиолетовый

спектр в потоке), соотношением интенсивностей сигнала детектора при разных длинах волн (хроматографическая чистота пика), так и данными, полученными при использовании других детекторов. Такие варианты идентификации требуют использования стандартных образцов определяемых компонентов.

Контроль большинства фармацевтических субстанций включает определение родственных компонентов или родственных примесей. Например, для субстанции кларитромицина определяют 16 родственных примесей. При этом стандартные образцы этих примесей либо очень дорогие, либо вообще недоступны. В таких случаях идентификацию примесей на хроматограмме проводят с использованием относительных времен удерживания [1-3].

Расчет относительных времен удерживания приводят по одной из нижеприведенных формул [2, 3]:

$$r_G = \frac{t_{r(i)}}{t_{r(st)}}, \quad (1)$$

или

$$r = \frac{t_{r(i)} - t_M}{t_{r(st)} - t_M}, \quad (2)$$

где: r_G – относительное время удерживания компонента i ; r – исправленное относительное время удерживания компонента i ; $t_{r(i)}$ – время удерживания интересующего компонента i ; $t_{r(st)}$ – время удерживания компонента, принятого за стандарт; t_M – время выхода не удерживаемого компонента.

Относительные времена удерживания являются наиболее устойчивыми характеристиками удерживания при изменении условий хроматографического разделения [4]. При проведении межлабораторных исследований воспроизводимость относительных времен удерживания показывает наилучшие результаты в сравнении с воспроизводимостью времен удерживания и факторов емкости [4].

Очень часто при воспроизведении методик полученные значения величин относительных времен удерживания отличаются от значений, указанных в нормативных документах; это может приводить к неправильной идентификации и, как следствие, отбраковке препарата или субстанции [5, 6]. При этом *ведущие фармакопеи мира не определяют критерии приемлемости для величины относительного времени удерживания*, и неизвестно, в каких пределах экспериментально полученные значения величин относительных времен удерживания могут отличаться от значений, указанных в нормативных документах.

Известно, что хроматографические колонки одного типа (например, C18) часто не обеспечивают сопоставимых характеристик разделения веществ. На сегодняшний день на рынке пред-

ставлено более 300 брендов различных колонок, заполненных наиболее популярным обращено-фазовым сорбентом C18 [7]. Такие сорбенты могут отличаться как по физико-химическим характеристикам (тип силикагеля, диаметр частиц сорбента, объем пор, удельная площадь поверхности), так и по хроматографическим свойствам; особенно важное различие в свойствах обращено-фазовых сорбентов, которое значительно влияет на хроматографическое поведение аналитов, это способ деактивации остаточных силанольных групп [8]. Все вышеприведенные факторы оказывают влияние на удерживание сорбатов [5; 9] и, следовательно, на величину относительного времени удерживания.

Целью данного исследования было определить вариабельность относительных времен удерживания, полученных для модельных смесей на различных хроматографических колонках, заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецилсилильными группами (C18) и разработать критерии приемлемости для идентификации компонентов по относительным временам удерживания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографическая система. Жидкостной хроматограф Agilent 1200, состоящий из вакуумного дегазатора (G1379B), четырехканального насоса (G1311A), автосамплера (G1329A), термостата автосамплера (G1330B), термостата колонок (G1316A), УФ-детектора (G1314B). Для управления хроматографом, сбора и обработки хроматографических данных использовали программное обеспечение Chem Station (G2170BA, rev B.02.01).

Реактивы. Метилпарабен (метилловый эфир п-гидрокси-бензойной кислоты), этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен (все с чистотой >99%, Acros, Бельгия). Ацетонитрил и метанол («HPLC grade», Sigma-Aldrich, Германия).

Тестовая смесь «Isocratic sample» (Agilent Technologies, USA). Состав (концентрация вещества в смеси): диметилфталат (1192 мкг/мл), диэтилфталат (1189 мкг/мл), бифенил (79.3 мкг/мл), о-терфенил (238 мкг/мл).

Тестовая смесь «LC Universal Test Mix» (Perkin Elmer, USA). Состав (концентрация вещества в смеси): толуол (1740 мкг/мл), этилбензол (1740 мкг/мл), изопропилбензол (1720 мкг/мл), трет-бутилбензол (1734 мкг/мл), антрацен (10 мкг/мл).

Во всех экспериментах использовали деионизированную воду (Direct-Q5, Millipore).

Хроматографические колонки. Исследования проводили на 11 хроматографических колонок, заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами

Таблица 1. Физико-химические характеристики хроматографических колонок, использованных для изучения вариальности относительных времен удерживания

№	Хроматографическая колонка	Размер колонки, мм	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Удельная площадь поверхности, м ² /г	Содержание углерода, %	Энд-кеппинг
1	ZORBAX Eclipse XDB-C18	150×4.6	5	80	180	10	да
2	Nukleosil120-5C18	250×4.6	5	120	350	11	да
3	Kromasil 100-C18	250×4.0	5	100	340	19	да
4	LiChrosorb RP-18	250×4.6	10	100	300	17	нет
5	ZORBAX SB-C18	250×4.6	5	80	180	10	да
6	Bondapack C18	300×3.9	10	125	330	10	Да
7	Hypersil ODS	200×2.1	5	120	170	10	Да
8	Kromasil C18	250×4.6	7	100	340	19	Да
9	Separon SG C18	150×4.0	5	100	120	18	да
10	Spheri RP-18	220×2.1	5	80	180	11	Да
11	ZORBAX SB-C18	50×2.1	1.8	80	180	10	Да

Названия и некоторые характеристики используемых колонок приведены в табл. 1. Колонка №11 представляет собой хроматографическую колонку для скоростного разделения, используемую в современных хроматографических системах быстрого разделения (RRLC) и сверхвысокого давления (UPLC).

Приготовление тестовых смесей. Модельную смесь 1 готовили растворением навесок метилпарабена, этилпарабена, пропилпарабена, бутилпарабена - в метаноле, с последующим разбавлением подвижной фазой до получения смеси компонентов в концентрациях 50 мкг/мл каждого компонента.

В качестве модельной смеси 2 использовали образец «Isocratic sample» (Agilent Technologies) для валидации хроматографических систем без дополнительного разведения.

В качестве модельной смеси 3 использовали образец «LC Universal Test Mix» (Perkin Elmer) для валидации хроматографических систем и тестирования хроматографических колонок без дополнительного разведения.

Условия хроматографического разделения.

Для разделения компонентов модельной смеси 1 условия хроматографического разделения были подобраны таким образом, чтобы фактор емкости (k) для соединения с наименьшим временем удерживания (метилпарабен) был не менее 1: подвижная фаза – ацетонитрил : вода (37:63 об/об), скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл/мин, температура термостата колонки – 35°C, объем пробы – 5 мкл, длина волны детектирования - 254 нм.

Для разделения компонентов модельной смеси 2 использовали условия хроматографического

разделения, описанные в методике для проверки хроматографов Agilent 1200 [10]: подвижная фаза – ацетонитрил : вода (65 : 35 об/об), скорость потока подвижной фазы – 1.5 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем пробы – 5 мкл, длина волны детектирования – 254 нм.

Для разделения компонентов модельной смеси 3 использовали условия хроматографического разделения, описанные в методике для проверки хроматографа Perkin Elmer Series 200 [11]: подвижная фаза – метанол : вода (70:30 об/об), скорость потока подвижной фазы – 1.5 мл/мин, температура термостата колонки – 35°C, объем пробы – 5 мкл, длина волны детектирования - 254 нм. Перед началом измерений хроматографическую колонку уравнивали подвижной фазой в течение 30 минут. Модельную смесь хроматографировали 3 раза; из полученных хроматограмм рассчитывали времена удерживания и ширины пиков у основания для компонентов модельных смесей. Для расчетов использовали среднее значения времен удерживания и ширины пиков у основания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования были выбраны хроматографические колонки, заполненные сорбентом на основе силикагеля с привитыми C18 группами. Все используемые колонки, несмотря на различия в их физико-химических параметрах (см. Таблицу 1), можно отнести к разряду колонок L1 по классификации фармакопеи Америки (октадецилсилан, химически привитый на пористый силикагель или керамические микрочастицы, 1.5-10 мкм в диаметре [2]) или силикагель октадецилсилильный для хромато-

графии *P* по классификации фармакопеи Европы [3] и гармонизированной с ней фармакопеи Украины [1] (силикагель очень тонко измельченный, с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм, поверхность которого химически модифицирована октадецилсилильными группами).

Использованные в данной работе модельные смеси содержат простые и предсказуемые с точки зрения хроматографического разделения соединения, характеризующиеся в основном гидрофобными взаимодействиями с сорбентом, и дающие наиболее воспроизводимые характеристики удерживания на обращено-фазовых сорбентах [12, 13].

Модельная смесь 1 – эфиры парагидроксibenзойной кислоты (парабены) – классический пример соединений для изучения метильной селективности на обращено-фазовых сорбентах. Модельную смесь 2 можно представить как две пары компонентов для изучения метильной и фенильной селективности – диметилфталат/диэтилфталат и бифенил/о-терфенил соответственно. Модельная смесь 3 содержит углеводороды, характеризующиеся только гидрофобным взаимодействием с сорбентом хроматографической колонки [12].

Для расчета относительных времен удерживания в каждой из модельных смесей был выбран один из компонентов как стандарт; в модельной смеси 1 был выбран бутилпарабен; в модельной смеси 2 – диэтилфталат; в модельной смеси 3 – трет-бутилбензол.

Относительные времена удерживания компонентов модельных смесей рассчитывали как отношения среднего значения времени удерживания компонента к среднему значению времени удерживания компонента, принятого за стандарт (формула 1). Вариабельность относительных времен удерживания оценивали как коэффициент вариации для относительных времен удерживания компонента модельной смеси, полученных на разных хроматографических колонках. Результаты расчетов приведены в таблице 2.

Полученные значения коэффициентов вариации для относительных времен удерживания находятся в достаточно широком диапазоне: от 4.7% до 27.2%. Как видно из таблицы 2, для компонентов со временем удерживания близким к времени удерживания стандарта, значения коэффициентов вариации значительно ниже, чем для компонентов с большим временем удерживания. В связи с этим, для уменьшения вариабельности, расчет относительных времен удерживания был произведен для пар компонентов с минимальным различием во времени удерживания. Значения относительных времен удерживания и коэффициенты вариации для пар компонентов представлены в табл. 3.

Полученные значения коэффициентов вариации для пар компонентов с различием в одну метильную группу составили в среднем 6%. Значение коэффициента вариации для пары компонентов бифенил - о-терфенил составило около 15%.

Таблица 2. Относительные времена удерживания компонентов модельных смесей

№ колонки	Модельная смесь 1						Модельная смесь 2				Модельная смесь 3		
	Метилпарабен	Этилпарабен	Пропилпарабен	Бутилпарабен	Диметилфталат	Диэтилфталат	Бифенил	О-терфенил	Толуол	Этилбензол	Изопропилбензол	Трет-бутилбензол	Антрацен
1	0.21	0.32	0.54	1.0	0.70	1.0	2.22	4.76	0.32	0.49	0.71	1.0	1.20
2	0.32	0.42	0.63	1.0	0.83	1.0	1.66	2.54	0.48	0.63	0.80	1.0	1.56
3	0.20	0.31	0.54	1.0	0.69	1.0	2.25	4.58	0.36	0.53	0.74	1.0	1.38
4	0.32	0.43	0.63	1.0	0.83	1.0	1.73	2.64	0.48	0.63	0.80	1.0	1.58
5	0.22	0.33	0.56	1.0	0.72	1.0	2.00	4.02	0.37	0.53	0.74	1.0	1.18
6	0.32	0.43	0.64	1.0	0.83	1.0	1.49	2.33	0.52	0.65	0.81	1.0	1.17
7	0.26	0.36	0.57	1.0	0.78	1.0	1.74	3.16	0.43	0.58	0.77	1.0	1.18
8	0.21	0.32	0.55	1.0	0.71	1.0	2.19	4.29	0.36	0.52	0.73	1.0	1.37
9	0.36	0.47	0.66	1.0	0.87	1.0	1.55	2.14	0.49	0.64	0.80	1.0	1.55
10	0.26	0.36	0.58	1.0	0.79	1.0	1.93	3.52	0.39	0.54	0.74	1.0	1.35
11	0.25	0.36	0.57	1.0	0.79	1.0	1.78	3.44	0.37	0.53	0.73	1.0	1.17
ср	0.27	0.37	0.59	1.0	0.78	1.0	1.87	3.40	0.42	0.57	0.76	1.0	1.34
SD	0.055	0.055	0.044	0.0	0.062	0.0	0.269	0.924	0.067	0.058	0.036	0.0	0.168
CV	20.8	14.7	7.4	0.0	8.0	0.0	14.4	27.2	16.2	10.1	4.7	0.0	12.6

Таблица 3. Относительные времена удерживания компонентов модельных смесей, рассчитанные для пар компонентов

	Модельная смесь 1			Модельная смесь 2			Модельная смесь 3			
№ колонки	Метилпарабен - тилпарабен	Этилпарабен - пропилпарабен	Пропилпарабен - бутилпарабен	Диметилфталат - диэтилфталат	Диэтилфталат - бифенил	Бифенил - О- терфенил	Толуол - этилбензол	Этилбензол - изопропилбензол	Изопропилбензол - трет-бутилбензол	Трет-бутилбензол - антрацен
1	0.66	0.58	0.54	0.70	0.45	0.47	0.67	0.69	0.71	0.83
2	0.75	0.68	0.63	0.83	0.60	0.66	0.77	0.79	0.79	0.64
3	0.65	0.58	0.54	0.69	0.44	0.49	0.69	0.72	0.74	0.72
4	0.75	0.68	0.63	0.83	0.58	0.65	0.77	0.79	0.80	0.63
5	0.67	0.60	0.56	0.72	0.50	0.50	0.70	0.72	0.74	0.85
6	0.74	0.68	0.64	0.82	0.67	0.64	0.80	0.80	0.81	0.85
7	0.71	0.63	0.57	0.78	0.58	0.55	0.74	0.75	0.77	0.85
8	0.66	0.59	0.55	0.71	0.46	0.51	0.68	0.71	0.73	0.73
9	0.78	0.71	0.66	0.87	0.65	0.72	0.77	0.79	0.80	0.65
10	0.71	0.63	0.58	0.79	0.52	0.55	0.71	0.73	0.74	0.74
11	0.72	0.63	0.57	0.79	0.56	0.52	0.71	0.72	0.73	0.86
среднее	0.71	0.64	0.59	0.78	0.55	0.57	0.73	0.75	0.76	0.76
SD	0.044	0.046	0.044	0.061	0.079	0.084	0.044	0.039	0.035	0.092
CV	6.2	7.2	7.40	7.9	14.4	14.7	6.0	5.3	4.6	12.2

И, наконец, вариабельность разделения не родственных компонентов составила 12% (пара трет-бутилбензол - антрацен) и 14% (пара диэтилфталат - бифенил).

Для оценки возможности правильной идентификации компонентов разделяемых смесей по их относительным временам удерживания были рассчитаны значения пиковой емкости [14] для диапазонов идентификации компонентов, ограниченных вариабельностью их относительных времен удерживания.

Под пиковой емкостью понимают количество разделенных хроматографических пиков компонентов, способных вместиться в определенный диапазон времени удерживания. Для ее оценки были рассчитаны доверительные интервалы ($P = 90\%$) для средних значений относительных времен удерживания. Затем, используя нижнюю и верхнюю границу доверительных интервалов и времена удерживания компонентов стандартов, были вычислены диапазоны времен удерживания для идентификации определяемых компонентов (формула 3).

$$\Delta t_r = t_{r,2} - t_{r,1} = (r_G + \Delta r_G) \cdot t_{r(st)} - (r_G - \Delta r_G) \cdot t_{r(st)} \quad (3)$$

Пиковую емкость рассчитывали как отношение диапазона времени удерживания для идентифи-

кации компонентов к ширине определяемого пика у основания (формула 4).

$$P = \frac{\Delta t_r}{w} \quad (4)$$

где: Δt_r - диапазон времени удерживания для идентификации компонента; $(r_G + \Delta r_G)$ - верхняя граница доверительного интервала для среднего значения RRT; $(r_G - \Delta r_G)$ - нижняя граница доверительного интервала для среднего значения RRT; $t_{r(st)}$ - время удерживания стандартного компонента; P - значение пиковой емкости; w - ширина пика у основания.

Рассчитанная пиковая емкость компонентов модельных смесей для каждой хроматографической колонки представлена в табл. 4.

Расчет проведен по значениям величин вариабельности для пар компонентов; представлены значения пиковой емкости компонентов, а в скобках указаны стандарты, по которым рассчитывали относительное время удерживания.

В табл. 5 представлены значения пиковой емкости для соединений, отличающихся на 1, 2 и 3 метильные группы в углеводородной цепи (модельная смесь 1) и в разветвлениях цепи (модельная смесь 3). В качестве стандартов для расчета относительных времен удерживания использованы бутилпарабен и трет-бутилбензол. Как видно из таблицы 4 для соединений, отличающихся наличием одной метильной группы, рассчитанная пиковая емкость не превышает 4.

Таблица 4. Рассчитанная пиковая емкость компонентов модельных смесей, для диапазона идентификации компонентов, ограниченного вариальностью относительных времен удерживания.

№ колонки	Модельная смесь 1			Модельная смесь 2			Модельная смесь 3			
	Метилпарабен (Этилпарабен)	Этилпарабен (Пропилпарабен)	Пропилпарабен (Бутилпарабен)	Диметилфталат (Диэтилфталат)	Диэтилфталат (Бифенил)	Бифенил (О-терфенил)	Толуол (Этилбензол)	Этилбензол (Изопропилбензол)	Изопропилбензол (Трет-бутилбензол)	Трет-бутилбензол (Антрацен)
1	2	3	3	2	5	7	2	2	2	4
2	2	2	2	2	4	4	2	2	1	5
3	2	2	2	2	4	5	2	2	1	4
4	2	2	2	2	4	4	2	1	1	4
5	3	4	4	3	6	8	3	3	2	5
6	1	2	2	2	3	3	1	1	1	2
7	1	1	2	1	2	4	1	1	1	3
8	2	2	2	2	4	5	2	1	1	3
9	1	1	1	1	2	2	1	1	1	3
10	1	1	1	1	2	3	1	1	1	3
11	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2

Таблица 5. Пиковая емкость для соединений, отличающихся на 1, 2 и 3 метильные группы в углеводородной цепи (модельная смесь 1) и в разветвлениях цепи (модельная смесь 3).

№ колонки	Модельная смесь 1				Модельная смесь 3			
	Метилпарабен	Этилпарабен	Пропилпарабен	Бутилпарабен	Толуол	Этилбензол	Изопропилбензол	Трет-бутилбензол
1	9	6	3	0	7	4	2	0
2	5	4	2	0	4	3	1	0
3	7	5	2	0	5	3	1	0
4	5	4	2	0	4	2	1	0
5	11	8	4	0	8	5	2	0
6	4	3	2	0	3	2	1	0
7	4	3	2	0	3	2	1	0
8	6	4	2	0	5	3	1	0
9	3	2	1	0	3	2	1	0
10	3	2	1	0	3	2	1	0
11	2	2	1	0	2	1	1	0

Для соединений, отличающихся на две и три метильные группы по сравнению с компонентом-стандартом (таблица 5), пиковая емкость составляет 5-8, хотя для колонки 5 (ZORBAX SB-C18) она достигает значения 11. Значения пиковой емкости для неродственных соединений и пары компонентов, отличающихся наличием одной фенильной группы, в среднем составляет 4 и достигает 8. Полученные данные показывают, что воспроизводя методику анализа и проводя идентификацию компонентов по их относитель-

ным временам удерживания, в диапазоне полученных средних величин вариальности могут находиться как минимум 3 разделенных хроматографических пика. При такой вариальности величин относительных времен удерживания **правильная идентификация интересующего компонента будет невозможна** без проведения дополнительных исследований. Если такие значения наблюдаются для простой модельной смеси (соединения, характеризующиеся в основном гидрофобными взаимодействиями с сорбентом),

то что же можно говорить о реальных объектах анализа, которые, как правило, содержат компоненты, не принадлежащие к одному гомологическому ряду, обладающие различными кислотно-основными свойствами и характеризующиеся более сложными взаимодействиями с сорбентом?

Логично предположить, что вариабельность относительных времен удерживания для реальных объектов анализа будет еще выше, чем полученная в данной работе для достаточно простых модельных смесей!

ВЫВОДЫ

Проведено изучение воспроизводимости относительных времен удерживания компонентов модельных смесей на 11 хроматографических колонках заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами. Полученные результаты показали высокую вариабельность относительных времен удерживания – от 5% до 15% относительного стандартного отклонения. При этом пиковая емкость диапазона для идентификации компонентов по их относительным временам удерживания достигает 11 и, следовательно, совпадение полученных значе-

ний относительных времен удерживания со значениями, описанными в методике, не может подтверждать идентификацию компонента, как и несовпадение – свидетельствовать об отсутствии компонента.

Критерии приемлемости для идентификации компонентов по их относительным временам удерживания не могут быть определены ввиду высокой вариабельности последних. *Относительные времена удерживания не могут быть использованы для надежной идентификации компонентов*; при анализе сложных многокомпонентных объектов они могут быть использованы лишь для информационных целей.

С целью снижения вариабельности величин относительных времен удерживания при воспроизведении хроматографических методик в условиях хроматографирования следует четко указывать торговую марку и тип хроматографической колонки, на которой была проведена разработка и валидация методики, а не ограничиваться общими фразами: колонка L1, как это делает фармакопея Америки, или силикагель с привитыми октадецилсилильными группами для хроматографии, как это делает фармакопея Европы и гармонизированная с ней фармакопея Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Державне підприємство «науково-експертний фармакопейний центр». Харків: ПЕПІГ, 2001. С. 556.
2. United States Pharmacopoeia, 35th edn. The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville MD, 2012. P. 4780.
3. European Pharmacopoeia 7th edn. Council of Europe: France, Strasbourg, 2010. P. 3310.
4. Gill R., Moffat A.C. A Collaborative Study to Investigate the Retention Reproducibility of Barbiturates in HPLC with a View to Establishing Retention Databases for Drug Identification. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24(4), 153–159.
5. Dehouck P., Visky D., Kovács Z., Noszá B., Adamsa E., Hoogmartensa J. Uncertainty Related to the Use of Relative Retention Times in Pharmaceutical Analysis. *LCGC Europe*. 2003, November, 1–8.
6. Lopez L.A., Rutan S.C. Comparison of methods for characterization of reversed-phase liquid chromatographic selectivity. *J. Chromatogr. A*. 2002, 965, 301–314.
7. Column selectivity database. In: <http://www.hplccolumns.org/database/index.php>.
8. Snyder L. R., Kirkland J.J., Dolan J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons: New York, 2012. P. 912.
9. Яшин Я. И., Яшин А. Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы. *Рос. хим. журн.* 2003, 47 (1), 64–79.
10. Інструкція 948-12-11 «Хроматографічні рідинні Agilent 1100, Agilent 1200, Agilent 1260 виробництва Agilent Technologies (США). Методика перевірки».
11. Інструкція МП Х 08,1541-2006 «Хроматограф жидкостной Series 200 фирмы «Perkin Elmer» (США). Методика поверки».
12. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns. *J. Chromatogr. A*. 2002, 960 (1-2), 19–49.
13. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: III. Results obtained with Kromasil C18 columns. *J. Chromatogr. A*. 1999, 855(2), 423–453.
14. Snyder L.R. Maximum resolution per unit time in liquid-solid absorption chromatography. Separation on column vs. thin layer. *Anal. Chem.* 1967, 39, 705–709.