

лебания температуры хроматографических помещений обычно не превышают 5 %, предельное изменение объема водных растворов не превышает 0.1 %, т.е. примерно соответствует точности поддержания скорости потока современных хроматографов [4].

Объемное расширение подвижной фазы за счет изменения температуры помещения равносильно умножению объема (или времени) удерживания всех хроматографируемых веществ на один и тот же коэффициент. Поэтому, если параллельно испытываемому декстрану хроматографируют маркер нулевого объема (V_o) и глюкозу (V_i), то из уравнения (1) видно, что коэффициенты распределения K_i остаются неизменными, т.е. не зависят от объемного расширения ПФ за счет изменения температуры помещения (предполагается, что в рамках одной серии анализов эта температура остается постоянной). Именно поэтому ЕФ, предъявляя жесткие требования к поддержанию температуры системы (± 0.1 °С), не предъявляет дополнительных (по сравнению с обычными фармакопейными – (15 – 25) °С) требований к температуре помещения.

Однако в некоторых случаях (см. ниже) для расчетов используются не коэффициенты распределения K_i , а сами объемы V_i (или времена) удерживания. При этом привязка V_i к реальным величинам V_o и V_t (через K_i) не проводится. Оценим влияние предельного температурного расширения водной подвижной фазы на определение ММР.

Для этого используем экспериментальные величины V_o и V_t и рассчитанные коэффициенты b_i (Табл. 4, Диол 1, $v=3$), подставляя их в уравнение (2). Расчеты проводим для исходных V_i и $V_{i'}$, умноженных на максимальный температурный коэффициент расширения водной подвижной фазы для перепада температур в 10 °С (1.0019). Результаты расчетов представлены в Табл. 2.

Как видно, искажение за счет изменения температуры помещения имеет минимум при 40 000 – 50 000 у.е. (2.02-2.13 %, что согласуется с предположительными оценками других авторов [4]), увеличиваясь при малых и при больших массах. С этой точки зрения нежелательно выходить за пределы фармакопейного диапазона молекулярных масс стандартов (4 000 – 250 000 у.е.).

Отметим, что полученные величины примерно соответствуют критическим значениям незначимости полной неопределенности анализа – см. ниже соотношение (12) [14].

Проведенные оценки показывают опасность использования объемов (или времен) удерживания вместо коэффициентов распределения K_i (1) в калибровочных уравнениях типа (2).

2.2. Калибровка

Данный вопрос является наиболее сложным в методике ЕФ и именно он определяет подход ЕФ.

Калибровка графическим методом чрезвычайно трудоемка. «Ручная» экстраполяция «S»-образной кривой вносит субъективный

Таблица 2

Влияние изменения комнатной температуры от 15 °С до 25 °С на определение молекулярной массы (М) декстранов различной молекулярной массы

$V_o = 10.00$ мл; $V_t = -19.02$ мл; $b_1 = -27.6114$, $b_2 = 37.68388$, $b_3 = -22.08295$, $b_4 = 17.45255$, $b_5 = -52.4223$

V	$K(V)$	$K(V \cdot 1.0019)$	$M(V)$	$M(V \cdot 1.0019)$	Искажение, %
18.164	0.905	0.909	1000	946	5.39
16.868	0.761	0.765	5000	4847	3.07
16.499	0.720	0.724	7000	6815	2.64
15.815	0.645	0.648	12000	11743	2.14
14.762	0.528	0.531	25000	24525	1.90
14.120	0.457	0.460	40000	39192	2.02
13.843	0.426	0.429	50000	48937	2.13
13.323	0.368	0.371	80000	78080	2.40
13.015	0.334	0.337	110000	107135	2.61
12.743	0.304	0.307	150000	145788	2.81
12.292	0.254	0.257	270000	261396	3.19
12.011	0.223	0.226	410000	395876	3.44
11.714	0.190	0.192	670000	644982	3.73