

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112
УДК 543.544; 615.074

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ: ВЛИЯНИЕ ПОПРАВОЧНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ И ПОЗДНО ВЫХОДЯЩИХ ПИКОВ ПРИМЕСЕЙ НА ТРЕБОВАНИЕ К ОТНОШЕНИЮ СИГНАЛ/ШУМ (ОБЗОР)

Н. А. Эпштейн^{1*}

¹ – Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, 13А

*Контактное лицо: Эпштейн Наум Аронович. E-mail: naumepshtein@gmail.com

Статья получена: 30.11.2018. Статья принята к печати: 18.01.2019

Резюме

Введение. В случае методик определения примесей нередко возникают проблемы, связанные как с установлением, так и с проверкой выполнения требования к необходимой чувствительности хроматографической системы.

Текст. Рассмотрено влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум (S/N) для проверки пригодности хроматографической системы.

Заключение. Даны рекомендации как обнаружить ситуации, при которых требование $S/N \geq 10$ недостаточно для надежного детектирования пиков всех примесей (родственных веществ), и при этом как скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению S/N для контроля пригодности системы.

Ключевые слова: отношение сигнал/шум, пригодность системы, поправочные коэффициенты, поздно выходящие пики, примеси, родственные вещества.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Эпштейн Н.А. Проверка пригодности хроматографической системы: влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(1): 108–112.

CHROMATOGRAPHIC SYSTEM SUITABILITY TESTING: INFLUENCE OF CORRECTION FACTORS AND LATE ELUTING PEAKS OF IMPURITIES ON THE REQUIREMENT FOR THE SIGNAL-TO-NOISE RATIO (REVIEW)

N. A. Epshtein^{1*}

¹ – Center of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky passage, Moscow, 115446, Russia

*Corresponding author: Naum A. Epshtein. E-mail: naumepshtein@gmail.com

Received: 30.11.2018. Accepted: 18.01.2019

Abstract

Introduction. In case of methods of impurities determination quite often there are problems connected both with establishment and with check of implementation of the requirement to necessary sensitivity of a chromatographic system.

Text. Influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio (S/N) for chromatographic system suitability testing is considered.

Conclusion. The recommendations are provided how to detect situations at which the requirement of $S/N \geq 10$ is insufficient for reliable detecting peaks of all impurities (related substances) and therewith how to correct concentration of test solution and/or the requirement to S/N for system suitability testing.

Keywords: signal-to-noise ratio, system suitability, correction factors, late eluting peaks, impurities, related substances.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Epshtein N. A. Chromatographic system suitability testing: influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio. *Drug development & registration.* 2019; 8(1): 108–112.

ВВЕДЕНИЕ

Проверка пригодности хроматографической системы (ППХС, SST – system suitability testing)) является обязательной процедурой для всех хроматографических методик контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Для методик определения содержания основных веществ установление и проверка выполнения требований ППХС обычно не вызывает проблем, так как контролируются такие характеристики пиков как число теоретических тарелок (N), фактор асимметрии ($T_{0,05}$), относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) и редко – разрешение между пиками (Rs) [1]. Однако в слу-

чае методик определения примесей нередко возникают проблемы, связанные как с установлением, так и с проверкой выполнения требования к необходимой чувствительности хроматографической системы (Sensitivity testing).

Согласно рекомендациям, опубликованным в [2–4], концентрация раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (ПЧХС) должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit; чаще всего 0,05%), а отношение сигнал/шум (S/N), рассчитанное для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС, должно быть не меньше 10 [2–4]. Эти рекомендации являют-

ся рамочными и не учитывают возможные особенности анализируемых объектов и получаемых хроматограмм. Поэтому не удивительно, что у разработчиков и пользователей методик определения примесей часто возникают вопросы, связанные с необходимой чувствительностью хроматографической системы и ее проверкой. Ответы на ряд таких вопросов можно найти в публикации [5]; в ней подробно рассмотрены критерии для выбора определенной концентрации раствора ПЧХС, условия, при которых следует брать концентрацию раствора ПЧХС на уровне большем или меньшем, чем 0,05%, случаи, когда нижняя граница требования к S/N может быть <10 и когда можно не использовать раствор ПЧХС, то есть не проверять чувствительность хроматографической системы. Там же указан и обоснован критерий приемлемости при наличии остаточного пика основного вещества на хроматограмме blank (холостого опыта): *площадь остаточного пика на хроматограмме blank* не должна превышать 10% от площади пика основного вещества на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы¹.

Цель статьи: в дополнение к [5] рассмотреть ситуации, при которых нижняя граница требования $S/N \geq 10$, то есть 10, может оказаться недостаточной для надежного детектирования пиков примесей; дать рекомендации, как обнаружить такие ситуации и при этом как скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению S/N для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего поясним, почему в качестве нижней границы требования к S/N для раствора ПЧХС в фармакопеех обычно указывают $S/N = 10$ [2–4]. Это связано с концентрацией раствора ПЧХС. Известно, что концентрация раствора ПЧХС должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit) [2], и поэтому концентрацию раствора ПЧХС берут на определенном уровне относительно концентрации испытуемого раствора, выбираемом специальным образом [5]. С другой стороны, концентрация раствора ПЧХС должна быть такой, чтобы можно было воспроизводимо (надежно) определять высоту пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Для методик определения примесей общепринятым критерием воспроизводимости площадей и, как следствие, высот пиков является требование: относительное стандартное отклонение площади пика ... не должно превышать 5,0%. Согласно теории, для пиков гауссовой формы относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) можно выразить через отношение S/N [6]:

$$RSD \approx 50/(S/N), \quad (1)$$

¹ Такой критерий очень важен, так как на практике нередко встречаются ситуации, когда невозможно полностью отмыть хроматографическую колонку от остаточного пика основного вещества.

или

$$S/N \approx 50/(RSD). \quad (2)$$

Подставив в (2) $\%RSD=5,0$ (т.е. 5,0%), получаем $S/N \approx 10$. Это, по-видимому, и являлось прямым или косвенным (см. примечание) основанием для выбора значения 10 в качестве нижней границы требования к S/N при проверке чувствительности хроматографической системы.

Примечание. Могут сказать, что нижняя граница требования к $S/N = 10$ выбрана из-за того, что $S/N=10$ соответствует пределу количественного определения (LOQ) [2, 7–9], устанавливаемому для хроматографических методик по отношению сигнал/шум базовой линии. Однако выбор $S/N=10$ в качестве критерия для LOQ тоже с большой вероятностью основывается на формулах (1) и (2), так как вряд ли случайно значение $S/N=10$ при LOQ точно соответствует $RSD=5,0\%$ по формуле (2).

Важно подчеркнуть, что введение раствора ПЧХС в проверку пригодности хроматографической системы предполагает контроль необходимой чувствительности хроматографической системы по отношению ко всем примесям. То есть предполагается, что если у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС отношение S/N будет ≥ 10 , то у всех примесей с содержанием на уровне порога игнорирования примесей отношение S/N будет не меньше предела обнаружения (LOD). Так как в соответствии с ICH при LOD отношение $S/N=3$ [8], то выполнение требования $S/N \geq 10$ у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС должно означать, что у всех примесей при их содержании на уровне порога игнорирования примесей с большой вероятностью $S/N \geq 3$. Практика показала, что в большинстве случаев это выполняется. *Однако могут быть ситуации, при которых нижняя граница требования $S/N \geq 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС (то есть $S/N \approx 10$) оказывается недостаточной для надежного детектирования всех примесей: некоторые примеси могут быть не видны или у них $S/N < 3$ при содержании (%) на уровне порога игнорирования примесей.* Можно выделить 2 основных индикатора для такого риска:

- **Первый индикатор:** время выхода последнего пика по результатам стрессовых исследований при валидации методики определения примесей или продолжительность хроматограммы испытуемого раствора значительно превышает время удерживания основного вещества (ориентировочно в 4 раза и более).

Этот индикатор связан с тем, что при увеличении времени выхода пика, согласно теории [6], происходит его уширение и, как следствие, уменьшение высоты вплоть до такой, при которой $S/N < 3$ – то есть меньше предела обнаружения [8] даже при выполнении условия $S/N \approx 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Наглядный пример такой ситуации для поздно выходящей примеси приведен на модельной хроматограмме на рисунке 1 (пояснение дано ниже). Поэтому, если при стрессовых исследова-

ниях [10] обнаружены поздно выходящие пики примесей и/или продолжительность хроматограммы для определения примесей значительно превышает время выхода пика основного вещества, то следует проверить, все ли примеси детектируются. Такую проверку можно провести, например, следующим образом. Берут хроматограф с диодно-матричным детектором и образец препарата (модельной смеси) или субстанции – в зависимости от объекта анализа, на конце срока годности (долгосрочное или ускоренное хранение)¹. Хроматографируют при номинальных условиях испытуемый раствор (концентрация основного вещества C_0), а также раствор плацебо или blank (при анализе субстанций) – для идентификации пиков плацебо и системных пиков. Сравнивают хроматограммы этих растворов с хроматограммами типа MaxPlot фирмы Waters [11] – на них пики веществ имеют максимальную высоту, так как на хроматограмму выводятся максимальные значения оптической плотности в рассматриваемом диапазоне длин волн (обычно от 200 до 350 нм). Делают вывод об отсутствии или о наличии дополнительных пиков примесей, то есть тех, которые имеются на хроматограмме испытуемого раствора, выведенной в режиме MaxPlot, однако, отсутствуют на хроматограмме этого раствора при рабочей длине волны. Если такие пики примесей имеются, то:

– в случае разработки методики увеличивают концентрацию испытуемого раствора от C_0 вплоть до такой минимальной концентрации (C_D) при которой у всех обнаруженных дополнительных пиков примесей отношение $S/N \geq 3$. Затем раствор с концентрацией C_D используют как испытуемый раствор по разрабатываемой методике. Характерно, что в подобном случае при сохранении концентрации испытуемого раствора C_0 невозможно обеспечить необходимую чувствительность хроматографической системы даже при ужесточении требования от $S/N \geq 10$ до $S/N \geq 50$ и более для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС;

– если не могут увеличить концентрацию испытуемого раствора до C_D , то рассматривают возможность увеличения объема пробы при инъекции, увеличения скорости потока подвижной фазы, введения/коррекции градиента, изменения рабочей длины волны и т.д.;

– при апробации/трансфере методики делают вывод о ее недостаточной чувствительности.

Примечание: при разработке методик определения примесей рекомендуем всегда проводить изложенную выше проверку наличия дополнительных пиков примесей.

- **Второй индикатор:** если на хроматограмме раствора ПЧХС $S/N \approx 10$ или немного больше десяти и есть примеси с поправочным коэффициентом $F > 1,25$.

¹ Если времени мало, то можно использовать ускоренное хранение модельной смеси препарата при температуре 60 °С и относительной влажности $W=75\%$ в течение 30 дней (эквивалент 2 лет) [13].

Если есть примеси, которые соответствуют второму индикатору, то в общем случае имеется риск того, что у такой примеси отношение S/N будет меньше 3 даже при выполнении требования $S/N \approx 10$ у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Поэтому для обеспечения необходимой чувствительности хроматографической системы целесообразно поступать следующим образом.

При отсутствии образцов примесей, удовлетворяющих второму индикатору, можно воспользоваться рекомендацией европейского руководства [2], в котором для примесей с поправочным коэффициентом большим, чем 1,25 предлагается корректировать требование к S/N путем умножения 10 на значение поправочного коэффициента примеси F , то есть:

$$S/N \geq F \cdot 10. \quad (3)$$

Если имеется несколько таких примесей, то:

$$S/N \geq F_{\max} \cdot 10, \quad (4)$$

где множитель F_{\max} – максимальное значение поправочного коэффициента для примесей, используемое в формуле для определения содержания примесей; $F_{\max} = 1$, если у всех примесей $F \leq 1,25$.

Отметим, что требования $S/N \geq F \cdot 10$ и $S/N \geq F_{\max} \cdot 10$ являются формальными, так как поправочный коэффициент зависит от отношения площадей, а не высот пиков [2], и при этом не учитывается увеличение высоты пика примеси, при прочих равных условиях, если пик примеси выходит до пика основного вещества. Тем не менее, *введение условия (3) или (4) в проверку пригодности (чувствительности) хроматографической системы снижает риск неправильной оценки содержания отдельных примесей и суммы примесей*, а это очень важно на практике.

При наличии образцов примесей, удовлетворяющих второму индикатору, для снижения риска недостаточной чувствительности хроматографической системы целесообразно использовать следующий подход. Готовят исходный раствор смеси примесей, у которых $F > 1,25$, с концентрацией примесей в 5 или более раз превышающей порог игнорирования примесей. Из этого раствора затем можно готовить растворы с меньшей концентрацией примесей путем взятия определенных аликвот. Инжектировать разбавленный раствор смеси примесей с концентрациями на уровне порога игнорирования примесей (C_N ; чаще всего 0,05% от концентрации испытуемого раствора для определения примесей). Если окажется, что у пиков этих примесей $S/N \geq 3$, то достаточно использовать требование $S/N \geq 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. В противном случае следует увеличить концентрацию примесей в растворе их смеси до такой (C_F), при которой у пиков всех примесей будет $S/N \geq 3$ и, соответственно, уточнить требование к отношению S/N для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС:

$$S/N \geq 10 (C_F/C_N), \quad (5)$$

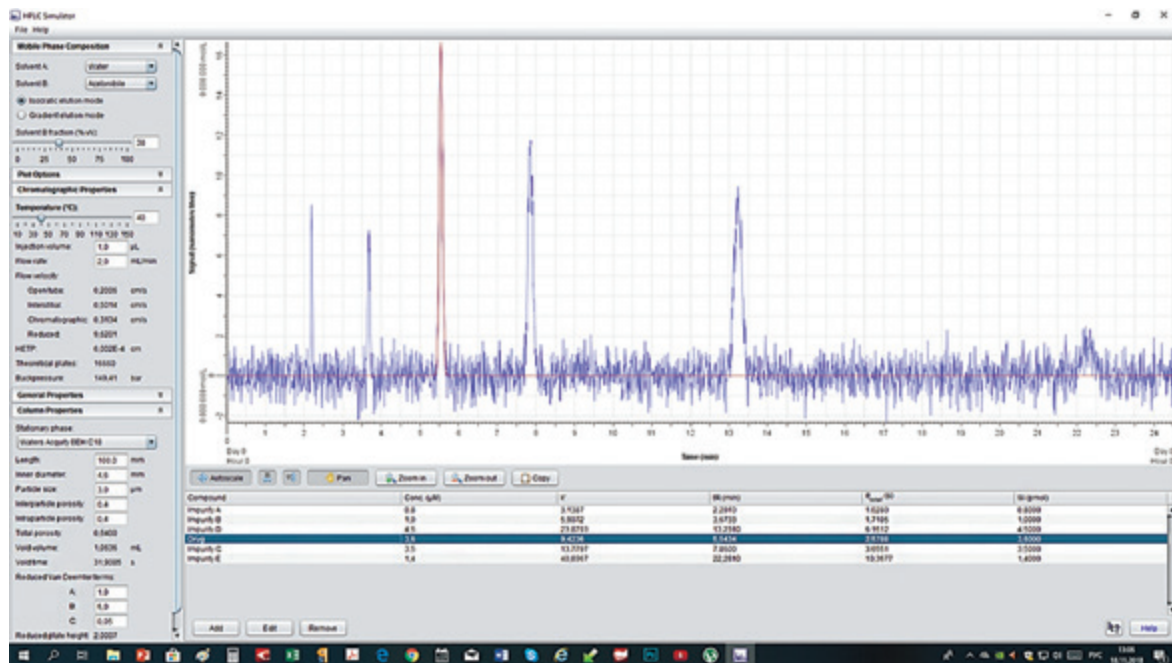


Рисунок 1. Исходная модельная хроматограмма раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (ПЧХС), дополненная для наглядности пиками 5 «примесей». Время удерживания (RT) основного вещества (пик красного цвета) около 5,5 мин, S/N≈10. Почти незаметен пик «примеси» с RT 22,3 мин на фоне шума базовой линии и у него S/N<<3

Figure 1. Initial model chromatogram of the solution for checking the sensitivity of the chromatographic system (PCHS), supplemented for clarity with peaks of 5 «impurities». The retention time (RT) of the main substance (red peak) is about 5.5 min, S/N≈10. The «impurity» peak is almost imperceptible with a RT of 22.3 minutes against the background noise of the baseline and its S/N<<3

где C_N – концентрация раствора смеси примесей с $F>1,25$ на уровне порога игнорирования примесей; C_F – минимальная концентрация аналогичного раствора, при которой у всех пиков примесей с $F>1,25$ отношение S/N≥3.

Для иллюстрации этого подхода на рисунках 1 и 2 приведены модельные хроматограммы раствора ПЧХС, на которых для наглядности добавлены пики 5 «примесей» помимо пика основного вещества. Эти хроматограммы получены с помощью компьютерной программы «HPLC Simulator 6.0» [12]. На хроматограмме исходного модельного раствора ПЧХС (рисунок 1) трудно заметить пик «примеси» с временем удерживания (RT) 22,3 мин¹. При этом у пика основного вещества с RT 5,5 мин отношение сигнал/шум S/N≈10. Для того, чтобы пик «примеси» с RT 22,3 мин можно было достаточно надежно детектировать и обсчитывать, то есть для достижения S/N≈3 (LOD), потребовалось увеличить концентрацию модельного раствора ПЧХС в 2,5 раза. В результате этого действия у пика «примеси» с RT 22,3 мин получили отношение S/N≈3, а у пика основного вещества с RT 5,5 мин S/N≈25 (рисунок 2). То есть в аналогичном реальном случае требование к отношению сигнал/шум для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС S/N≥10 было бы не-

достаточным для определения содержания всех примесей и его следовало заменить на S/N≥25.

Подчеркнем, что условие (5) дает возможность более надежно оценивать необходимую чувствительность хроматографической системы для методик определения примесей с поправочными коэффициентами $F>1,25$, чем (3) и (4), так как оно основывается на реальном тестировании необходимой чувствительности хроматографической системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены ситуации, при которых нижняя граница требования S/N≥10, то есть 10, может оказаться недостаточно большой для надежного детектирования пиков примесей. Показано как можно обнаружить такие ситуации и как при этом скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению S/N для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС, чтобы обеспечить надежное определение примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А., Емшанова С. В. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2008; 42(11): 34–40.
2. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th Ed. European Pharmacopoeia. 2015.
3. United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Москва. 2018; 1: 863.

¹ Программа «HPLC Simulator 6.0», как и другие компьютерные программы, моделирующие хроматограммы, не дает возможности вводить значение поправочного коэффициента F. Поэтому моделировали F путем уменьшения концентрации примеси с RT 22,3 мин по сравнению с концентрацией основного вещества.

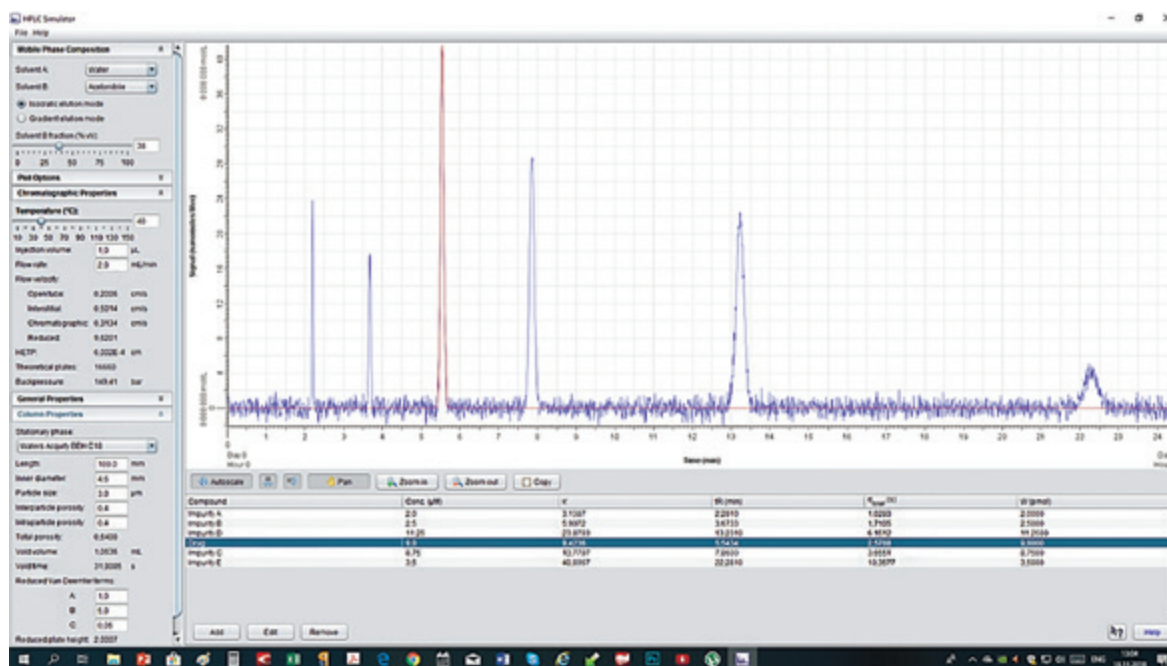


Рисунок 2. Хроматограмма раствора ПЧХС полученная путем увеличения концентрации исходного модельного раствора ПЧХС (рисунок 1) в 2,5 раза. При этом у «примеси» с RT 22,3 мин значение S/N≈3. У пика основного вещества с RT 5,5 мин значение S/N≈25

Figure 2. Chromatogram of the PCHA solution obtained by increasing the concentration of the initial model PCHA solution (Figure 1) 2.5 times. At the same time, the «impurity» with RT is 22.3 min and the value S/N≈3. At the peak of the main substance with RT 5.5 min, the value of S/N≈25

- Эпштейн Н. А. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы. *Ведомости НЦЭСМП*. 2017; 7(2): 85-91. Available at: https://www.researchgate.net/publication/318041495_ABOUT_ADMISSIBLE_VALUES_OF_DISREGARD_LIMITS_FOR_IMPURITIES_AND_SIGNAL-TO-NOISE_RATIO_WHEN_CHECKING_CHROMATOGRAPHIC_SYSTEM_SENSITIVITY_O_dopustimyh_znacheniah_poroga_ignorirovania_primesej_i_otnosenia_s
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. *Practical HPLC Method Development*. 3rd ed. – New Jersey: J. Wiley. 2010.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
- Эрмер Й., Миллер Д. Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК. 2013.
- Эпштейн Н. А. О стрессовых экспериментах при разработке / усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 3(16): 54–68. Available at: https://www.researchgate.net/publication/309858541_ABOUT_STRESS_EXPERIMENTS_BY_DEVELOPING_IMPROVING_ANALYTICAL_METHODS_AND_TECHNOLOGY
- Increase Waters 996 Photodiode Array Detector Sensitivity with Maxplot. Waters. 2000. Available at: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp06.pdf>
- HPLC Simulator 6.0. Available at: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
- Эпштейн Н. А. Совместимость лекарственных и вспомогательных веществ при разработке лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018; 52(7): 50–60. Available at: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/3993>.
- Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th Ed. European Pharmacopoeia. 2015.
- United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
- Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 2: 1004 (In Russ.).
- Epshtein N. A. About admissible values of disregard limits for impurities and signal-to-noise ratio when checking chromatographic system sensitivity. *The Bulletin of the Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017; 7(2): 85-91 (In Russ.). Available at: https://www.researchgate.net/publication/318041495_ABOUT_ADMISSIBLE_VALUES_OF_DISREGARD_LIMITS_FOR_IMPURITIES_AND_SIGNAL-TO-NOISE_RATIO_WHEN_CHECKING_CHROMATOGRAPHIC_SYSTEM_SENSITIVITY_O_dopustimyh_znacheniah_poroga_ignorirovania_primesej_i_otnosenia_s
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., *Practical HPLC Method Development*. 3rd ed. – New Jersey: J. Wiley. 2010.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. – Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
- Ermer Y., Miller, D. H. McB. Validation techniques in pharmaceutical analysis. Examples of best practices. – М.: ВИАЛЕК. 2013
- Epshtein N. A. About stress experiments by developing/improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Drug Development & Registration*. 2016; 3(16): 54–68 (In Russ.). Available at: https://www.researchgate.net/publication/309858541_ABOUT_STRESS_EXPERIMENTS_BY_DEVELOPING_IMPROVING_ANALYTICAL_METHODS_AND_TECHNOLOGY
- Increase Waters 996 Photodiode Array Detector Sensitivity with Maxplot. Waters. 2000. Available at: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp06.pdf>
- HPLC Simulator 6.0. Available at: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
- Epshtein N. A. Compatibility between drugs and excipients when developing dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018; 52(7); 50–60. Available at: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/3993>.

REFERENCES