https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136
УДК 543.544; 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор)

Н. А. Эпштейн[1]*

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

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

ORCID: Н. А. Эпштейн – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Статья поступила: 23.06.2020. **Статья принята в печать:** 09.07.2020. **Статья опубликована:** 28.08.2020

Резюме

Введение. При разработке и валидации методик определения примесей важно тестировать спектральную чистоту пиков (SPP) основных веществ с помощью диодно-матричных детекторов (DAD).

Текст. Подчеркнуто, что задачей тестирования SPP является обнаружение незаметных коэлюирующихся примесей под пиком основного вещества, а не контроль абсолютной чистоты пика. Тестирование SPP снижает риск получения недостаточно специфичной методики. В связи с этим рассмотрены основные критерии и ключевые моменты для оценки спектральной чистоты пиков при использовании компьютерных программ хроматографов Agilent, Shimadzu и Waters.

Заключение. Даны рекомендации, которые следует учитывать для корректной оценки спектральной чистоты пиков при разработке хроматографических методик и валидации их специфичности.

Ключевые слова: чистота пика, диодно-матричный детектор, жидкостная хроматография, примеси, Agilent, Shimadzu, Waters.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор участвовал в сборе информации, её анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136

Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review)

Naum A. Epshtein[1]*

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

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

ORCID: Naum A. Epshtein – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Received: 23.06.2020. **Revised:** 09.07.2020. **Published:** 28.08.2020

Abstract

Introduction. When developing and validating methods of impurity determination, it is important to test the spectral peak purity (SPP) of the main substances using diode array detectors (DAD).

Text. It is emphasized that the task of testing SPP is to detect invisible coeluting impurities under the peak of the main substance, and not the control the absolute purity of the peak. SPP testing reduces the risk of getting non enough specific methods. In this regard, we considered the main criteria and key points for assessing the spectral purity of peaks when using computer programs of Agilent's, Shimadzu's, and Waters's chromatographs.

Conclusion. Recommendations are given, which should be taken into account for the correct assessment of spectral purity of peaks during development of chromatographic methods and validation of their specificity.

Keywords: peak purity, diode array detector, liquid chromatography, impurities., Agilent, Shimadzu, Waters.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The author participated in the collection of information, its analysis and in writing the text of the article.

For citation: Epshtein N. A. Validation of chromatographic methods: checking the peak purity and the specificity of methods with diode array detectors. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136

© Эпштейн Н. А., 2020
© Epshtein N. A., 2020

ВВЕДЕНИЕ

При валидации хроматографических методик рекомендуется для подтверждения их специфичности оценивать чистоту хроматографических пиков веществ [1–3]. В руководстве по валидации ЕАЭС говорится: «Для доказательства соответствия пика определяемого вещества только одному компоненту целесообразно провести исследования на чистоту пиков (например, использование диодно-матричного детектирования, масс-спектрометрии)» [3]. Известно, что для оценки чистоты хроматографических пиков наиболее подходят хромато-масс-спектрометрические детекторы [4–6] и ЯМР [7], особенно при их одновременном использовании. При этом могут применяться методы двумерной и препаративной хроматографии [8, 9]. Для таких исследований требуются значительные затраты финансов и времени. Поэтому они используются редко преимущественно при разработке методик анализа новых фармацевтических субстанций. В то же время при разработке и валидации методик анализа лекарственных препаратов и известных фармацевтических субстанций часто проводят оценку спектральной чистоты пиков [10–17]. Для этого применяют диодно-матричные детекторы (DAD). Они широко распространены и дают возможность быстро получать и оценивать подобие спектров в точках пика в заданном диапазоне длин волн. С теоретической точки зрения пик, у которого спектры подобны во всех точках является спектрально чистым. Нарушение подобия спектров, то есть спектральной чистоты пика используется как индикатор наличия примеси (примесей).

Для обычного пользователя компьютерная оценка спектральной чистоты пиков является «черным ящиком», к которому прикладываются определенные общие указания с необходимыми действиями. Однако без знания ключевых моментов даже строгое соблюдение этих действий может приводить как к ложно положительным, так и к ложно отрицательным выводам о коэлюирующихся примесях под пиком основного вещества. Целью статьи является:

- рассмотрение ключевых моментов, знание которых необходимо для корректной оценки спектральной чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов;
- представление рекомендаций по оценке и критериям чистоты пиков для хроматографов Agilent, Waters и Shimadzu.

В литературе имеются справедливые замечания о том, что спектральная чистота пика недостаточна для оценки его реальной чистоты (например, [18]). Тем не менее с практической точки зрения проверка спектральной чистоты пиков (SPP) чрезвычайно важна, так как снижает риск получения недостаточно специфичной методики. В соответствии с этим следует подчеркнуть, что ***основной задачей тестирования спектральной чистоты пиков (SPP) при разработке и валидации методик является обнаружение незаметных коэлюирующихся примесей (invisible coeluting impurities) под пиком основного вещества, а не контроль абсолютной чистоты пика***. Речь идет об обнаружении именно незаметных коэлюирующихся примесей, которые не проявляют себя в виде пиков или явных перегибов на фронте или хвосте пика основного вещества.

Компьютерные программы Agilent (ChemStation), Waters (Empower) и Shimadzu (LabSolutions) используют различные критерии и графики для оценки спектральной чистоты пиков (они рассмотрены ниже). Тем не менее эти программы базируются на следующих общих ключевых моментах:

- ✓ Спектр в каждой точке пика представляется в виде вектора (матрицы данных) в *n*-мерном пространстве, где *n* – число данных «длина волны – оптическая плотность»;
- ✓ Для сопоставления спектров в одном масштабе проводится их нормализация. Обычно она выполняется путем масштабирования спектров по наилучшему совпадению или путем нормализации «по максимуму-минимуму» для представления спектров в одних и тех же пределах [12];
- ✓ Количественную оценку подобия (similarity) спектров в точках хроматографического пика проводят по формуле типа [14]:

$$r = \cos\theta = \frac{\sum(A_{apex.i} - \bar{A}_{apex})(A_{j.i} - \bar{A}_j)}{\sqrt{\sum(A_{apex.i} - \bar{A}_{apex})^2 \sum(A_{j.i} - \bar{A}_j)^2}}, \qquad (1)$$

где r – коэффициент корреляции между спектрами; θ – purity angle или spectral contrast angle; A – оптическая плотность; индекс *apex* относится к вершине пика, индекс *i* к длине волны, индекс *j* к точке пика. *Из этой формулы следует, что спектр в вершине пика рассматривается как эталонный, свойственный 100%-му веществу. Для получения эталонного спектра чаще всего используют вершину пика на хроматограмме типа MaxPlot* [19–21][1]. Компьютерная программа Agilent по умолчанию использует усредненный спектр в 5 определенных точках пика в качестве эталонного спектра. В таком случае в формуле (1) индекс *apex* следует заменить на *av* (average).

Примечание. Дополнительно программа Agilent дает возможность альтернативного выбора эталонного спектра: на фронтальной части или на хвосте пика.

С теоретической точки зрения формула (1) является достаточной для оценки подобия спектров в разных точках пика пиков при условии, что «спектральный шум» равен нулю. Однако на практике это не так.

[1] «На хроматограмме MaxPlot для каждого момента времени выводится максимальное значение поглощения в заданном диапазоне длин волн» [19].

Например, шум базовой линии может вносить существенный вклад в вариабельность спектра [14] и приводить к ложноположительному результату. Для минимизации такого риска определяют спектры в области хроматограммы вблизи рассматриваемого пика или в точках непосредственно перед началом и сразу после конца пика – там, где нет пиков веществ и системных пиков. На основании этих спектров оценивают пороговые значения Threshold для допустимого различия между спектрами (не вызванного наличием примеси). В [14] приведены расчетные формулы для определения Threshold компьютерными программами Agilent и Shimadzu. Компьютерная программа Waters для расчета Threshold использует сумму углов Noise Angle (угол шума) и Solvent Angle (угол растворителя).

Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Agilent

Для оценки подобия спектров в точках пика используют коэффициент подобия *Similarity Factor* [12]:

$$SF = 1000 \cdot r^2, \quad (2)$$

где r – коэффициент корреляции, вычисляемый по формуле (1). Теоретически при $SF = 1000$ имеет место полное совпадение спектров. При $SF < 990$ различие между спектрами рассматривается как значимое, то есть указывает на то, что пик не является спектрально чистым [12, 20].

По значениям *SF* в точках пика строится кривая подобия спектров *Similarity Curve*. Предельные значения допустимого различия спектров в точках пика – Threshold вычисляется автоматически или задаются вручную. Критерием спектральной чистоты пика является расположение кривой Similarity Curve ниже кривой Threshold в Purity Window. То есть у спектрально чистого пика *SF* < *Threshold*. В тех областях пика, в которых кривая *SF* расположена заметно выше Threshold высока вероятность наличия коэлюирующейся примеси (примесей). Значение Threshold можно вычислять автоматически опцией *Calculate Threshold* или задавать вручную. По нашему опыту, если автоматически определяемое значение Threshold превышает 995, то целесообразно *задавать вручную Threshold 995*. Это соответствует рекомендации Agilent для ручного выбора Threshold: от 995 до 998 [20].

Примечание. Аналогом коэффициента подобия спектров *SF* является Match Factor (*MF*). Значения Match Factor вычисляются по формуле [20]:

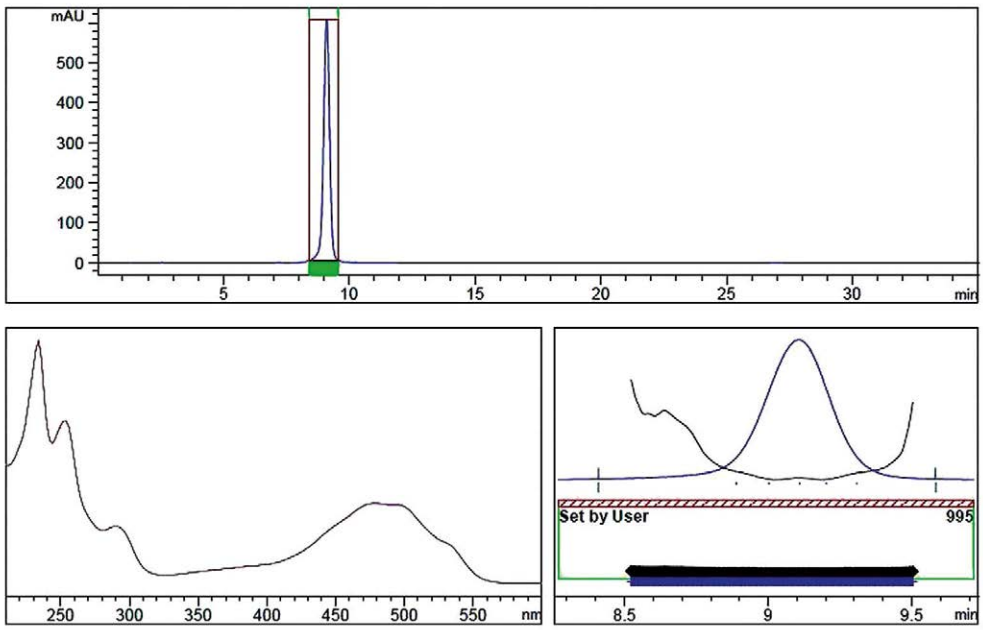
$$MF = 1000 \frac{\left[\sum x_i \cdot y_i - \left(\frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n}\right)\right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \left(\frac{\sum x_i \cdot \sum x_i}{n}\right)\right] \cdot \left[\sum y_i^2 - \left(\frac{\sum y_i \cdot \sum y_i}{n}\right)\right]}, \quad (3)$$

где x_i и y_i – значения абсорбции на первом и втором спектре при одинаковой длине волны i; n – количество точек данных. Спектры идентичны при $MF = 1000$; спектры рассматриваются как разные при $MF < 990$ [20].

Следует обратить особое внимание на выбор спектра сравнения во вкладке Reference Spectra. Его используют для компенсации влияния компонентов подвижной фазы, а также компонентов матрицы образца в испытуемом растворе. Имеются 3 возможности. *None* – без выбора спектра сравнения; этот режим обычно не используют. *Manual* – ручной выбор интервала для определения спектра сравнения. Он является обязательным, если рассматриваемый пик разделен от соседнего пика не на уровне базовой линии (подробности рассмотрены в [12]). *Automatic* – автоматическое определение спектра сравнения. Этот режим задан по умолчанию. При нем обычно выбирают *All Spectra* – используются спектры начала и конца пика вблизи базовой линии. Имеется также режим *Peak controlled Spectra* – только спектр в начале пика. Он менее надежный; при выборе этого режима Agilent рекомендует использовать наименьшее допустимое значение Threshold = 990 [20].

На рисунке 1 приведена типичная форма информации, выводимой при оценке спектральной чистоты пиков компьютерной программой Agilent. Вверху – участок хроматограммы с рассматриваемым пиком. Внизу слева Spectra Window – окно спектров. Внизу справа – окно Purity Window. В нем показан обсчитываемый пик без нанесенных размерностей. Под пиком расположены Similarity Curve черного цвета и Threshold Curve красного цвета (если значения Threshold вычисляются автоматически) или красная полоса (если значение Threshold задано вручную). Еще ниже выводятся две жирные линии: черная и синяя, если пик спектрально чистый; черная и красная, если пик не спектрально чистый. Под графическими данными выводятся числовые значения Purity Factor (а не Similarity) и Threshold. Значение Purity Factor вычисляется по специальному алгоритму, использующему спектры в определенных точках пика [12]. Эти точки располагаются под Similarity Curve и маркируются в виде красных крестиков или точек [20]. Важно отметить, что *критерием спектральной чистоты пика является условие Purity Factor > Threshold; оно противоположно по знаку рассмотренному выше условию спектральной чистоты пика SF < Threshold*. В случае спектрально чистого пика выводится сообщение «The purity factor is within the calculated threshold limit». В противном случае выводится сообщение «The purity factor exceeds the calculated threshold limit». При этом «exceed» переводится как «выходит за пределы», а не как «превышает» значение Threshold.

Для более четкого определения места нахождения потенциальной примеси под пиком основного вещества можно сделать следующее. Войти во вкладку




```
-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 999.967 (148 of 148 spectra are within the threshold limit.)
Threshold     : 995.000  (Set by user)
Reference     : Peak start and end spectra (integrated) (8.410 / 9.584)
Spectra       : 5  (Selection automatic, 5)
```

Рисунок 1. Пример оценки чистоты пика компьютерной программой Agilent. Вверху – участок хроматограммы с пиком вещества

Figure 1. An example of assessment of peak purity by Agilent computer program. At the top is a part of chromatogram with a peak of a substance

Advanced Peak Purity Options, затем в *Purity Calculation* и выбрать *Ratio* (вместо *Purity Ratio,* которое задано по умолчанию). Тогда будет выводиться кривая Similarity/Threshold ratio, вычисляемая в соответствии с формулой:

$$Ratio = \frac{1000 - SF}{1000 - \text{Threshold}}. \quad (4)$$

На кривой Similarity/Threshold ratio у спектрально чистого пика значения *Ratio* будут <1 во всех точках пика. При нарушении спектральной чистоты пика значения *Ratio* будут >1 в той области пика, в которой велика вероятность нахождения коэлюирующейся примеси [12].

Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Waters

Последовательность действий для оценки чистоты пиков на хроматографах Waters программой Empower подробно изложена в [19; 22–25]. В [22–24] приведены окна с параметрами настраиваемыми пользователями и типичные значения этих параметров. Рассмотрим некоторые ключевые моменты.

Для оценки спектральной чистоты пика определяют угол чистоты пика Purity Angle [θ в формуле (1)] и пороговое значение допустимого различия между спектрами – Purity Threshold. *Условием для спектрально чистого пика является Purity Angle < Purity Threshold. Более надежной альтернативой для оценки чистоты пика является график Purity Plot (рисунок 2). На этом графике для спектрально чистого пика кривая Purity*

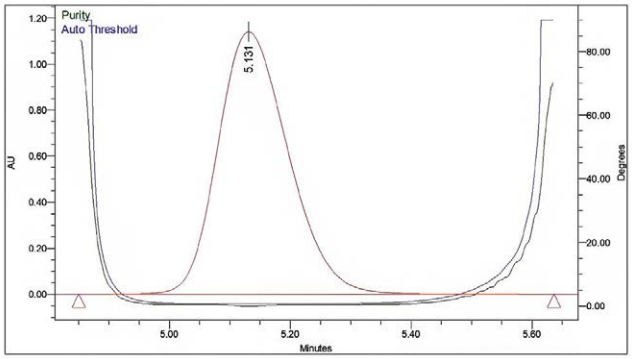


Рисунок 2. Пример оценки спектральной чистоты пика компьютерной программой Waters. Пик спектрально чистый, так как кривая Purity расположена ниже, чем кривая Auto Threshold и расчетное значение Purity Angle 0,286 меньше Purity Threshold 0,768

Figure 2. An example of assessment of peak purity by Waters computer program. The peak is spectrally pure because the Purity curve is lower than the Auto Threshold curve and the calculated Purity Angle 0,286 is less than the Purity Threshold 0,768

(зеленого цвета) должна идти ниже кривой Threshold (синего цвета)[1].

На практике при разработке и валидации методик иногда встречается «противоречивая ситуация». С одной стороны, в таблице обсчета пика наблюдается значение Purity Angle меньше Purity Threshold – пик спектральной чистый. С другой стороны, на графике Purity Plot имеется область, в которой кривая Purity располагается выше, чем кривая Threshold – пик не является спектрально чистым. При этом на график Purity Plot может выводиться буква «M» (Maximum Impurity) и вертикальная черта в точке условного пика примеси (пояснение дано ниже в примечании). Основная причина рассматриваемого противоречия заключается в следующем. В таблице обсчета пика приводятся средневзвешенные значения Purity Angle и Purity Threshold. В отличие от этого кривые Purity и Threshold строятся на основании значений Purity Angle и Purity Threshold в конкретных точках пика. Поэтому при такой «противоречивой ситуации» надежнее делать вывод о наличии потенциальной коэлюирующейся примеси на основании Purity Plot. Характерный пример, подтверждающий этот вывод приведен в [25]. Показано, что при оценке чистоты пика основного вещества в модельной смеси с примесью на сравнительно высоком уровне 0,5 % значение Purity Angle 0,137 < Purity Threshold 0,301. Напротив, на Purity Plot имеется область, в которой кривая Purity идет выше, чем кривая Threshold. Следовательно, *оценка чистоты пика на основании Purity Plot более надежна, чем по условию Purity Angle < Purity Threshold*.

Примечание. На графике Purity Plot вертикальная черта с буквой «M» проводится через точку пика с максимальным превышением значения Purity Angle над Purity Threshold. Для включения этой опции надо пометить в настройках Purity → Plot Properties галочкой *Annotate Peak Apex/Max. Impurity*. В качестве альтернативы в таблицу обсчета пика можно вводить столбец *Maximum Impurity*, в котором указывается значение времени удерживания примеси, коэлюирующейся под пиком основного вещества.

Для проверки спектральной чистоты пика рассматриваемого вещества целесообразно использовать опцию *Auto Threshold*. При этом высота пика должна быть в пределах 1000 mAU. В этом режиме программа автоматически вычисляет Noise Angle (в заданном диапазоне) и Solvent Angle. Если окажется, что Purity Angle > Purity Threshold, то результат можно перепроверить. Для этого следует вручную определить *Solvent Angle* с использованием стандартного образца вещества. Алгоритм этой процедуры подробно изложен в [26]. При отсутствии стандартного образца можно взять значение Solvent Angle = 1,00.

[1] При автоматическом определении кривая Threshold обозначается как Auto Threshold.

Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Shimadzu

В [21] рассмотрены общие сведения для оценки чистоты пика на хроматографах Shimadzu, перечислены основные настройки и их назначение. Здесь рассмотрим некоторые ключевые моменты.

Для оценки спектральной чистоты пика определяют индекс чистоты пика *Peak Purity Index* (PPI), который соответствует *r* в формуле (1) и пороговое значение в точке *Single Point Threshold* (SPT). Кроме этого, вычисляется минимальный индекс чистоты пика *Min Peak Purity Index* = (Peak Purity Index – Single Point Threshold) · 10^6. *Пик является спектрально чистым, если PPI ≥ SPT и соответственно Min Peak Purity Index (MPI)* ≥ 0. При отрицательном значении MPI указывается время, соответствующее наиболее вероятной точке пика, в которой коэлюируется примесь. Заметим, что абсолютное значение MPI не связано с концентрацией примеси.

Для графического представления результатов оценки чистоты пика можно использовать графики чистоты пика (Purity Curve; рисунок 3) или подобия спектров (Similarity Curve). *На графике чистоты пика у спектрально чистого пика кривая чистоты Purity Curve (черного цвета) должна находиться выше нулевой линии (красного цвета).* Нарушение этого условия указывает на наличие коэлюирующейся примеси. Характерный пример показан на рисунке 3.

Альтернативный график – подобия спектров используется редко. На графике подобия спектров у спектрально чистого пика кривая подобия Similarity Curve (черного цвета) должна находиться выше кривой Threshold Curve (красного цвета). Заметим, что на графике подобия спектров выводится пик, получаемый на хроматограмме MaxPlot. Поэтому высота этого пика может значительно отличаться от той, которая получается при рабочей длине волны.

Программное обеспечение Shimadzu дает возможность использовать 3 метода для оценки чистоты пика [21]:

a) The 3-point peak purity method использует спектры в 3 точках: на восходящей ветви пика, в максимуме пика (эталонный спектр) и на нисходящей ветви пика. Это менее точный метод, чем два следующих.
b) The N-point peak purity method является расширением предыдущего метода и использует спектры в 5, 7 или 9 точках пика.
c) *Total peak purity* method использует спектры во всех точках пика. Это метод является наиболее надежным. Его особенностью является то, что в качестве эталонного спектра берется спектр той точки пика, в которой поглощение вещества максимально в рассматриваемом диапазоне длин волн. Эта точка соответствует максимуму пика на хроматограмме типа MaxPlot. На практике *в настройках рекомен-*

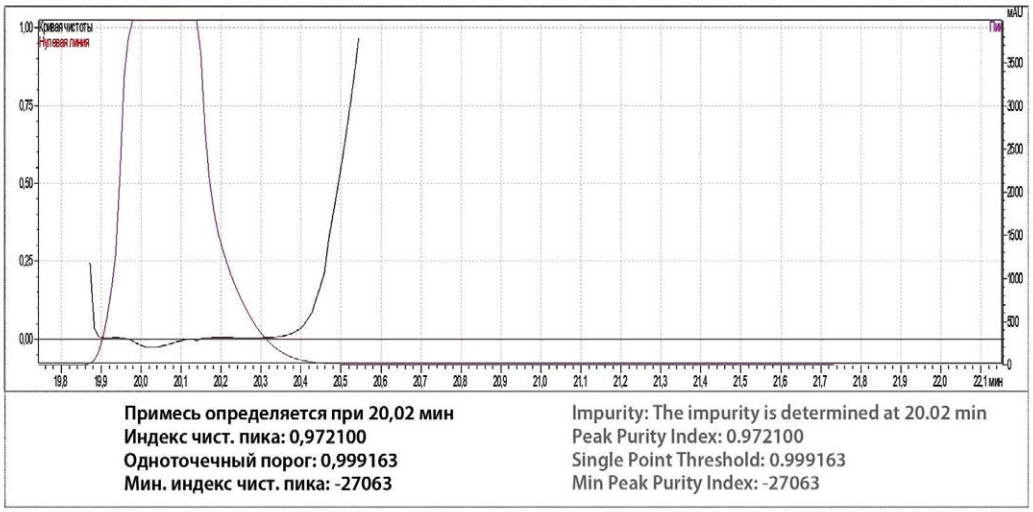


Рисунок 3. Пример оценки спектральной чистоты пика компьютерной программой Shimadzu. Пик не является спектрально чистым. На это указывает то, что кривая чистоты пика (черного цвета) опускается ниже нулевой линии (красного цвета) и минимальный индекс чистоты пика меньше нуля

Figure 3. An example of assessment of peak purity by Shimadzu computer program. The peak is not spectrally pure. This is indicated by the fact that the peak purity curve (black) falls below the zero line (red) and the Min Peak Purity Index is less than zero

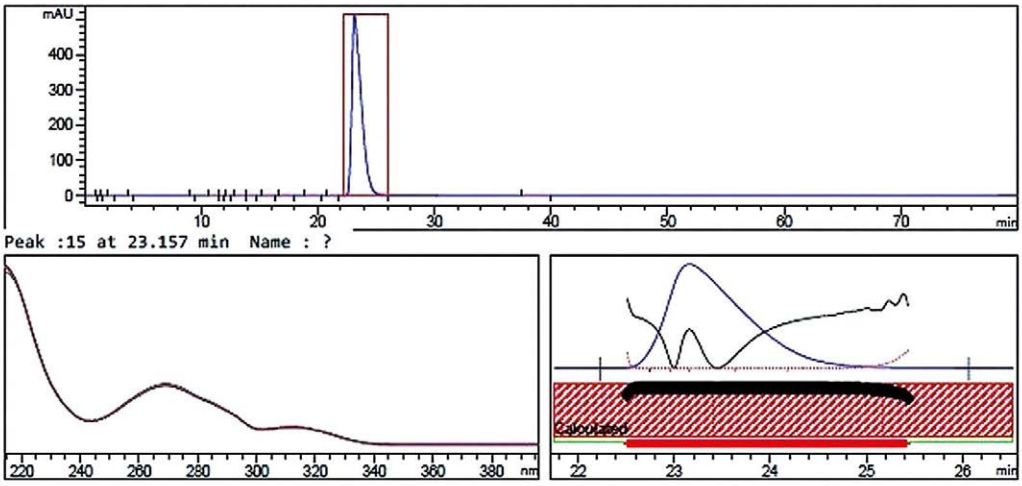
дуем выбирать Total peak purity method, так как методы a) и b) менее надежны при оценке чистоты пика. Они применялись раньше, когда мощность компьютеров была сравнительно невелика.

Обращаем внимание еще на 3 момента. Следует включить:

- ✓ *Compute noise spectrum from current data for peak purity* – в противном случае программа может использовать ранее записанный шум базовой линии.
- ✓ *Background Compensation* – для компенсации дрейфа базовой линии.
- ✓ При валидации методики значение *Compensation Coefficient* должно быть 0 (по умолчанию).

Общие рекомендации для повышения надежности оценки чистоты пиков на хроматографах Agilent, Waters и Shimadzu

1. *При оценке чистоты пиков не рекомендуется использовать длины волн λ ниже 210 нм* [20, 21]. Это связано с риском значительного увеличения вклада компонентов подвижной фазы в получаемые спектры в области низких длин волн. Обычно выбирают диапазон 210–350 нм или 210–400 нм. При необходимости корректируют границы диапазона длин волн, как показано в следующем пункте.
2. *При задании границ диапазона λ целесообразно оценивать максимальную высоту рассматриваемого пика на графике типа MaxPlot*. Если высота пика будет слишком большой (пункт 7), то может потребоваться коррекция границы диапазона λ. На рисунке 4 приведен характерный пример, полученный на начальной стадии разработки методики на хроматографе Agilent. На нем представлен результат оценки чистоты пика лекарственного вещества в диапазоне 210–400 нм. Видно, что высота пика на снятой хроматограмме около 500 mAU (верхняя часть рисунка). Однако имеется предупреждение о том, что поглощение превышает 1000 mAU: «Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU». Это обусловлено тем, что в максимуме спектра поглощения вещества (внизу рисунок слева) при $\lambda \approx 215$ нм абсорбция более, чем в 2 раза превышает аналогичный показатель при рабочей длине волны $\lambda \approx 270$ нм. Для проверки этого предположения взяли начальную λ не 210 нм, а 225 нм. Это привело к исчезновению упомянутого выше предупреждения о недопустимо большой высоте пика.
3. *Следует использовать наименьшее разрешение длин волн (Resolution), а также такую скорость сбора данных в секунду (Sampling Rate; SR), которая обеспечит достаточное количество точек на пик для оценки чистоты пика (Peak Purity)*. В случае Waters этим условиям соответствует Resolution 1,2 нм и не менее 12 точек (спектров) на пик [22]. Второе условие особенно важно для узких пиков, которые характерны для градиентной ВЭЖХ (gradient HPLC) и УЭЖХ (UPLC). Зная ширину рассматриваемого пика *W* [сек] и минимально необходимое количество спектров на пик *N*, можно вычислить минимальное значение $SR = N/W$ точек в секунду.
4. *Для большей надежности оценки чистоты пика рекомендуем вручную размечать точки начала и конца рассматриваемого пика*. Это особенно важно для частично перекрывающихся пиков.




```
-> The purity factor exceeds the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.704 (440 of 440 spectra exceed the calculated threshold limit.)
Threshold     : 999.993  (Calculated with 440 of 440 spectra)
Reference     : Peak start and end spectra (integrated) (22.226 / 26.060)
Spectra       : 5  (Selection automatic, 5)
Spectra       : Smooth 5
Noise Threshol: 0.012  (12 spectra, St.Dev 0.0055 + 3 * 0.002)
Warning       : Spectral absorbances > 1000 mAU (see help for more information)
```

Рисунок 4. Результаты обсчета чистоты пика лекарственного вещества компьютерной программой Agilent, полученные на начальной стадии разработки методики. Высота пика при рабочей длине волны около 500 mAU. Однако есть сообщение: Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU. Причина этого противоречия объяснена в тексте. *Примечание*. Автоматически рассчитанное значение Threshold слишком большое; надо установить Threshold = 995

Figure 4. Results of the calculation of drug peak purity by Agilent computer program, obtained at the initial stage of development of the procedure. The peak height at a working wavelength of about 500 mAU. However, there is a message: Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU. The reason for this contradiction is explained in the text. *Note*: The automatically calculated Threshold value is too large. It is necessary to set the Threshold = 995

5. *Следует обращать особое внимание на шум базовой линии.* Он не должен быть большим, в противном случае можно получить ложноотрицательный результат «пик чистый». Например, для Waters по нашим данным на недопустимо большой уровень шума базовой линии указывают значения Purity Threshold значительно превышающие единицу.
6. *Интервал хроматограммы для определения шума базовой линии* следует выбирать на хроматограмме типа MaxPlot, а не при рабочей длине волны. Дело в том, что при рабочей длине волны на хроматограмме могут оказаться незаметными пики, высота которых может быть значительно большей при других λ в заданном диапазоне длин волн. Эти пики могут сильно влиять на значение Threshold и, как следствие, на результаты оценки чистоты пика.
7. *Рекомендуется, чтобы высота пика (H) не превышала 1000 mAU на хроматограмме типа MaxPlot* [19, 20, 23]. В противном случае можно получить ложно положительный результат о наличии коэлюирующейся примеси. Дело в том, что при увеличении высоты пика увеличивается различие в концентрации вещества *C* между его верхней и нижними точками, участвующими в вычислении чистоты пика. Из-за этого у слишком высоких пиков может нарушаться закон Бугера – Ламберта – Бера, выполнение которого необходимо для обеспечения подобия спектров у чистого вещества [23]. В то же время заметим, что на практике мы получали оценку пика ЛВ как спектрально чистого до 1500–1600 mAU, в том числе при стрессовых испытаниях (Stress Testing) специфичности методик [27]. Согласно рекомендации Agilent для оценки спектральной чистоты пиков *оптимальной является высота пика в области от 250 до 800 mAU* [20].
8. *При негативном результате оценки чистоты высокого пика целесообразно проверить соблюдение линейной зависимости площади пика S от концентрации C при разведении инжектируемого раствора.* Следствием нарушения линейной зависимости *S* от *C* является нарушение подобия спектров даже при отсутствии коэлюирующейся примеси. Характерный пример рассмотрен в [28]. Нарушение линейной зависимости *S* от *C* у высокого пика можно проверить путем разведения инжектируемого раствора, например, в 2 раза. При этом, по нашему опыту, отклонение фактического значения площади пика от теоретического не должно превышать нескольких процентов.

9. *Если негативный результат оценки спектральной чистоты пика вещества вызывает сомнение, то рекомендуем хроматографировать при тех же условиях фармакопейный (аттестованный) стандартный образец этого вещества*. Затем сравнить результаты оценки чистоты пика, полученные для испытуемого вещества и для его стандартного образца. Предположим, что результаты, полученные для испытуемого вещества, окажутся не хуже, чем для стандартного образца. Тогда этот факт можно использовать для обоснования достаточной чистоты пика основного вещества. Предлагаемый способ особенно важен для градиентных методик. Для них негативный результат может быть вызван изменением состава подвижной фазы в точках хроматографического пика.

Компьютерные программы для оценки спектральной чистоты пиков совершенствуются. Предлагаются новые алгоритмы, которые повышают чувствительность определения примесей и дают возможность оценивать спектральную чистоту пиков при более высоких концентрациях (большей высоте пиков), например [29]. Это повышает надежность определения примесей коэлюирующихся под пиком основного вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение подчеркнем, что для разработки и валидации методик определения примесей на современном уровне необходимо контролировать спектральную чистоту пиков основных (лекарственных) веществ. При этом целесообразно рассматривать не только хроматограмму испытуемого раствора для определения примесей, но и хроматограммы растворов, получаемых при стрессовых исследованиях[1].

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *ICH*, 2005. 13 p.
2. United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of compendial procedures. USP41–NF36. 2018.
3. Guidance on the validation of analytical methods for testing drugs. EAEU. 2018. 25 c. (In Russ.).
4. Bylund D., Danielsson R., Markides K. E. Peak purity assessment in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatography A*. 2001;915: 43–52. Doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00543-X.
5. Dyrstad K., Hvattum Er., Jara S., Lie A. Peak-purity by LC-MS and LC-DAD (presentation). 2015.
6. Dong M. W. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, 2nd Ed. Hoboken, United States: *Wiley*. 2019.
7. Shockcor J. P. HPLC–NMR Pharmaceutical Applications. Du Pont Pharmaceuticals Co. Newark, NJ, USA: *Elsevier*. 2017. 271 p.
8. Shackman J. G., Kleintop B. L. Peak purity assessment in a triple-active fixed-dose combination drug product related substances method using a commercial two-dimensional liquid chromatography system. *J. Sep. Sci.* 2014;37:2688–2695. Doi: https://doi.org/10.1002/jssc.201400515.
9. Zhang K., Wang J., Tsang M., Wigman L., Chetwyn N. Two-Dimensional HPLC in Pharmaceutical Analysis. *Amer. Pharm. Review*. 2013;16(7):39–44.
10. Polstera J., Sauerwald N., Feucht W., Treutter D. New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography. *J. Chromatography A*. 1998;800:21–133. Doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01132-1
11. Levin Sh. Considerations in Peak Purity Measurements (presentation). 1999. 60 p.
12. Stahl M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. Application. Waldbronn, Germany: *Agilent Technologies*. 2003. 16 p.
13. Papadoyannis I. N., Gika H. G. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. In Encyclopedia of Chromatography. N.Y.: *Marcel Dekker, Inc*. 2003.
14. Rutan S. C., Venkatramani C. J., Stoll D. R. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part I: Basic Concepts, Commercial Software, and Limitations. *LC-GC North America*. 2018;36(2):100–110.
15. Cook D. W., Rutan S. C., Venkatramani C. J., Stoll D. R. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part II: Potential of Curve Resolution Techniques. *LC-GC North America*. 2018;36(4):248–255.
16. Stoll D. R., Venkatramani C. J., Rutan S. C. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part III: Using Two-Dimensional Liquid Chromatography. *LC-GC North America*. 2018;36(6):356–361.
17. Mas S., de Juan A. Peak Purity and Resolution of Chromatographic Data in Chemometrics in chromatography. Boca Raton: *CRC Press*. 2018.
18. Letter W. Peak Purity Determination by HPLC Diode Array Detector (DAD/PDA) based Chromatography Software (Limitations and Uses). *Conference «HPLC diode array method development training course» presented at NJ (USA)*. 1996. Doi: https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29067.90409.
19. Empower PDA Software Getting Started Guide. *Waters Corporation*. 2002. 145 p.
20. Agilent ChemStation for LC 3D Systems Understanding Your Spectra Module. Understanding Your Spectra Module. *Agilent Technologies*. 2008. 48 p.
21. LabSolutions Data Acquisition & Processing Theory Guide. Kyoto: *Shimadzu Corporation*. 2012. 84 p.
22. Tip #134: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 1). Available at: https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-134-3d-pda-data.
23. Tip #135: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 2). Available at: https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-135-3d-pda-data.
24. Tip #136: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 3). Available at: https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-136-3d-pda-data.
25. Tip #137: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 4). Available at: https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-137-3d-pda-data.
26. How do you set up the Purity Thresholds in Empower 3? Waters Knowledge Base: WKB11215.
27. Epshtein N. A. About stress experiments by developing / improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2016;3(16):118–132 (In Russ.).
28. Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity III. Interpretation of peak purity plots. *Waters*. 1996. Available at: https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=1536113
29. Mito (Shimadzu) Ya. Chromatogram Peak Purity Determination Apparatus. United States patent US 2014/0067283 A1, 2014 Mar. 6. Available at: https://patents.google.com/patent/US20140067283A1/en.

[1] При стрессовых исследованиях разложение лекарственного вещества должно быть сравнительно небольшим, «чтобы минимизировать протекание вторичных реакций, которые маловероятны при хранении фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» [27].