

О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы

Н. А. Эпштейн

Автономное объединение «ШТАДА ФармДевелопмент»,
АО «НИЖФАРМ», 109029, Российская Федерация,
Москва, Автомобильный проезд, д. 6

Статья поступила 02.03.2017 г. Принята к печати 29.05.2017 г.

Резюме: Рассмотрены актуальные вопросы, связанные с допустимыми значениями порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы. Даны рекомендации, в том числе по «типичным» и максимально допустимым значениям порога игнорирования примесей. Показано, что требование, согласно которому отношение сигнал/шум должно быть не менее 10, в некоторых случаях является неоправданно жестким: могут иметься достаточно весомые доводы для обоснования меньшего значения отношения сигнал/шум для раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, например, в случае идентифицированных примесей, определяемых по отдельной методике, когда пик примеси выходит до пика основного вещества.

Ключевые слова: отношение сигнал/шум; раствор для проверки чувствительности; порог игнорирования примесей; хроматографическая система; фармакопей.

Библиографическое описание: Эпштейн НА. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(2): 85–91.

В настоящее время проверка чувствительности хроматографической системы (ПЧХС) в методиках определения примесей в лекарственных препаратах (ЛП) и субстанциях является обязательной. С этой целью используют специальный раствор для ПЧХС (далее — раствор ПЧХС). При государственной регистрации ЛП и фармсубстанций эксперты требуют: а) чтобы раствор ПЧХС имел концентрацию (относительно испытуемого раствора) на уровне предела не учитываемых примесей/порога игнорирования примесей или на уровне предела количественного определения, и б) чтобы при хроматографировании раствора ПЧХС отношение сигнал/шум (S/N) было не менее 10. В Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания (ГФ РФ XIII) включено развернутое требование к отношению S/N [1]:

— «отношение S/N для пика вещества, полученное для раствора с концентрацией, равной требуемому уровню минимально определяемой концентрации, должно быть не менее 10. Требуемый уровень минимально определяемой концентрации [фактический предел количественного определения (ПКО)] зависит от того, предполагает ли методика вычисление содержания примесей, или только полуколичественную оценку, когда результат представляется в виде «менее X » или «не более X », где X — допустимое содержание примеси. Для методик, предполагающих вычисление содержания примесей, минимальная определяемая концентрация для применяемой хроматографической системы не должна превышать значение порога игнорирования (если не указано иное — 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе). Для полуколичественных методик минимальная определяемая концентрация для применяемой хроматографической системы не должна превышать максимально допустимое содержание примеси. При необходимости оценки со-

держания нескольких примесей требуемый уровень минимально определяемой концентрации для применяемой хроматографической системы определяется примесью, нормы содержания которой наиболее строги. Если в фармакопейной статье не указано иное, то раствор вещества минимально определяемой концентрации для оценки чувствительности детектирования можно приготовить растворением стандартного образца вещества в том же растворителе, который используется для приготовления испытуемого раствора, с уровнем концентрации 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе».

Однако эти требования к ПЧХС не дают ответ на ряд актуальных для практики вопросов:

- 1) Что представляет собой «порог игнорирования» примесей и на основании каких данных его следует выбирать?
- 2) Для всех ли методик определения примесей следует использовать раствор ПЧХС?
- 3) Почему рекомендуется концентрация раствора ПЧХС (минимальная определяемая концентрация) на уровне 0,05 % от концентрации испытуемого раствора, если не указано иное?
- 4) Каким должно быть требование к S/N при наличии примесей с поправочными коэффициентами?
- 5) Всегда ли для растворов ПЧХС отношение S/N для пика основного вещества должно быть 10 и выше, или в отдельных обоснованных случаях S/N для пика основного вещества может быть меньше 10, и при этом обеспечивается необходимая (эквивалентная) чувствительность хроматографической системы относительно пиков примесей?
- 6) Что делать, если на хроматограмме blank имеется небольшой, вариабельный по высоте остаточный пик основного вещества, который практически невозможно полностью удалить?

Цель работы — рассмотрение актуальных вопросов о допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы.

ПОРОГ ИГНОРИРОВАНИЯ ПРИМЕСЕЙ И ЕГО ДОПУСТИМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В ГФ РФ XIII при описании требований к отношению S/N используется один из вариантов дословного перевода общепринятого в англоязычной литературе термина «disregard limit» — «порог игнорирования». Однако для адекватного понимания термина «disregard limit» его лучше переводить как «порог игнорирования примесей» или «предел неучитываемых примесей». В Европейской фармакопее (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) приведено наиболее полное определение порога игнорирования примесей: «disregard limit» в хроматографических тестах — номинальное содержание (примеси), при котором или ниже которого пики/сигналы не учитываются при расчете суммы примесей [2, 3]. Количественные значения «disregard limit» и «reporting threshold» обычно одинаковы. Из этого определения вытекают два важных следствия.

Во-первых, если указан порог игнорирования примесей, например, 0,05 %, то не учитывают не только примеси, содержание которых меньше 0,05 %, но и примеси с содержанием 0,05 %.

Во-вторых, в качестве типичного значения порога игнорирования примесей рекомендуется использовать «reporting threshold» — порог регистрации примеси, то есть содержание примеси, требующее ее включения в спецификацию¹. В руководстве EDQM [4] дано пояснение о том, что обычно типичное значение «disregard limit» устанавливают в соответствии с «reporting threshold» и контролируют по специальному раствору сравнения (аналог раствора ПЧХС). При этом приведена ссылка на требования к «reporting threshold» для фармацевтических субстанций в Ph. Eur. [1, 5]:

- 0,05 % — при суточной дозе препарата ≥ 2 г;
- 0,03 % — при суточной дозе препарата > 2 г.

Для ЛП допускаются более высокие значения «reporting threshold»:

- 0,1 % — при суточной дозе препарата ≤ 1 г;
- 0,05 % — при суточной дозе препарата > 1 г [6].

Из приведенных данных следует, что для подавляющего большинства субстанций и препаратов «reporting threshold», а, следовательно, и порог игнорирования примесей, равен 0,05 %; это объясняет причину, по которой в ГФ РФ XIII рекомендуется концентрация раствора ПЧХС (минимальная определяемая концентрация) на уровне 0,05 % от концентрации испытуемого раствора, если не указано иное.

В соответствии с приведенными значениями «reporting threshold», уровень концентрации растворов ПЧХС относительно концентрации испытуемого раствора не должен превышать (если не обосновано иное):

- 0,03 % — для субстанций при суточной дозе препарата > 2 г;

- 0,05 % — для субстанций при суточной дозе препарата ≤ 2 г и для препаратов при их суточной дозе > 1 г;

- 0,1 % — для препаратов при их суточной дозе ≤ 1 г.

Следует подчеркнуть, что речь идет именно о типичных значениях порога игнорирования примесей и соответствующих им концентрациях растворов ПЧХС, а, следовательно, могут быть и иные значения, если они достаточно обоснованы. Например, очевидно, что для высокотоксичных примесей значение «reporting threshold» может оказаться $\ll 0,01$ %.

На практике иногда возникает проблема, как обосновать необходимость порога игнорирования примесей большего, чем «reporting threshold», вызванная тем, что даже при использовании современного аналитического оборудования не удается получить значение отношения $S/N \geq 10$ на уровне «reporting threshold». Такая ситуация может возникнуть, например, при проведении экспертизы препаратов:

а) с низкой дозировкой лекарственного вещества (ЛВ), не содержащего хромофорных групп;

б) комбинированных препаратов, в которых необходимо определять много примесей и соотносить их с соответствующими ЛВ. Это вызывает повышенное требование к разделяющей способности хроматографической системы (ХС), и как следствие — иногда требует увеличения порога игнорирования примесей по сравнению с указанными выше типичными значениями. Очевидно, что уровень (%) концентрации раствора ПЧХС не должен превышать нормируемое содержание неидентифицированных примесей, которое регламентируется требованиями ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения) к «Identification threshold» — порогу идентификации примеси [6]. В соответствии с этими требованиями, для ЛП максимальный уровень концентрации растворов ПЧХС (относительно концентрации испытуемого раствора) не должен превышать:

- 0,2 % — при суточной дозе препарата от «более 10 мг до 2 г»;

- 0,5 % — при суточной дозе препарата от 1 до 10 мг;

- 1 % — при суточной дозе препарата менее 1 мг.

Требования к методикам, в которых определяется только одна примесь, имеют свои особенности. В руководстве EDQM указано, что если по методике определяется только одна примесь и используется внешний стандарт, то нет необходимости в пороге игнорирования [4]. Это означает, с одной стороны, что, *если по методике определяется только одна примесь и ее содержание определяется по площади пика основного вещества, а не по стандарту этой примеси, то требуется использовать раствор ПЧХС с концентрацией на уровне порога игнорирования примеси.* С другой стороны, *если используется внешний стандарт примеси, то нет необходимости в растворе ПЧХС.* Это можно объяснить следующим образом. При хроматографировании стандартных растворов примесей (на уровне нормирования их содержания) обычно требуется, чтобы относительное стандартное отклонение %RSD площади пика при последовательных инъекциях было не

¹ Перевод «reporting threshold» в соответствии с: URL: <http://www.multitran.ru/c/m.exe?a=68&UserName=peregrin&l1=1&l2=2>.

больше 5,0 %. Поскольку для пиков гауссовой (симметричной) формы, согласно теории [7, 8]:

$$\%RSD \approx 50/(S/N) \text{ и } S/N \approx 50/(\%RSD), \quad (1)$$

то требование $\%RSD \leq 5,0 \%$ соответствует $S/N \geq 10$, что аналогично требованию к раствору ПЧХС.

В общем случае, в том числе и для несимметричных пиков, для методик ВЭЖХ требованию $S/N \geq 10$ соответствует значение $\%RSD \leq 6,1 \%$, согласно формуле [7]:

$$\%RSD = 58/(S/N) + 0,30. \quad (2)$$

Хотелось бы отметить, что формула (2) была получена на основании большого количества экспериментальных данных при различных уровнях концентраций лекарственных веществ и консервантов в диапазоне S/N от 2 до более чем 10000.

ДОПУСТИМЫЕ ПРЕДЕЛЫ ОТНОШЕНИЯ СИГНАЛ/ШУМ ПРИ ПРОВЕРКЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

В настоящее время отношение (S/N) рассчитывается по формуле [1, 2, 9]:

$$S/N = H/(h/2) = 2H/h, \quad (3)$$

где H — высота пика на хроматограмме раствора стандартного образца/раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии; h — размах фонового шума, измеряемый либо на хроматограмме контрольного (холостого) раствора (или раствора плацебо), либо на хроматограмме того же раствора стандартного образца. Экстраполяцию базовой линии проводят для сигнала на участке базовой линии во временном интервале, продолжительность которого — не менее пятикратного значения ширины пика на его полувысоте. Измерение размаха фонового шума также обычно проводят во временном интервале, продолжительность которого не меньше пятикратного значения ширины пика на его полувысоте, расположенном, если это возможно, равномерно по обе стороны от пика основного вещества [1, 2, 9].

Современные хроматографы оснащены программами для автоматического определения отношения S/N , однако в них заложены разные алгоритмы вычисления S/N . Рекомендуем использовать вычисление S/N по Ph. Eur. и указывать в методиках определения примесей. В пользу такого выбора говорит также то, что в USP (United States Pharmacopoeia, Фармакопея США) [9] включены все определения, рисунки и таблицы из главы 2.2.46 Ph. Eur. [2], которая содержит все перечисленные требования к вычислению отношения S/N . Автоматическое определение S/N наряду с очевидным достоинством имеет и существенный недостаток, иногда проявляющийся на практике. Дело в том, что получаемое значение S/N зависит не только от фактического шума базовой линии и алгоритма определения S/N , заложенного в программу, но и от заданного порогового значения — «threshold (slope) value», используемого для поиска и интегрирования пиков [10]. Поэтому значение «threshold (slope) value» должно быть таким, чтобы в области определения шума базовой линии интегрировались пики примесей, но не интегрировались «пики», вызванные флуктуациями базовой линии.

При определении примесей в лекарственных препаратах и фармсубстанциях может возникнуть вопрос: почему при проверке чувствительности хроматографической системы, как правило, требуют, чтобы S/N было бы не меньше 10? Ответ, казалось бы, заключается в следующем: значение S/N , равное 10, соответствует пределу количественного определения (LOQ) по ICH [11–13], и поэтому *только* значения S/N выше 10 можно считать достаточными для надежного определения примесей. Но только ли значения $S/N \geq 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС можно считать достаточными для надежного определения примесей? Для ответа на этот вопрос, а также на другие поставленные во введении вопросы рассмотрим:

- влияние времени выхода пиков примесей на значение S/N ;
- влияние фактора асимметрии пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС на значение S/N ;
- влияние поправочных коэффициентов идентифицированных примесей на значение S/N для растворов ПЧХС;
- наличие и условия использования значений S/N , не превышающих 10, в требованиях к чувствительности хроматографической системы в Ph. Eur. и USP.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ВЫХОДА ПИКОВ ПРИМЕСЕЙ НА ЗНАЧЕНИЕ S/N

Известно, что площадь пика вещества пропорциональна его концентрации и при увеличении времени удерживания вещества происходит размывание его пика [8]. Следовательно, если у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС $S/N = 10$, то при прочих равных условиях можно ожидать, что у пиков примесей, выходящих перед пиком основного вещества, будет $S/N > 10$, а после пика основного вещества $S/N < 10$; при этом имеется в виду, прежде всего, одинаковый уровень концентрации² основного вещества в растворе ПЧХС и примесей в испытуемом растворе. На рисунке 1 представлена модельная хроматограмма смеси веществ одинаковой концентрации, полученная с помощью компьютерной программы «HPLC Simulator 6.0» [14]. Были подобраны такие условия хроматографирования, при которых пик бензофенона (5,6 мин), выбранный как аналог пика «основного вещества» на хроматограмме раствора ПЧХС, имеет $S/N \approx 10$. У пиков, выходящих до пика «основного вещества», $S/N > 10$, а после него — $S/N < 10$. У пика октанона (34,1 мин) $S/N \approx 1,5$, то есть даже меньше значения $S/N = 3$, соответствующего пределу детектирования по ICH. Расчет по формуле (2) показал, что относительное стандартное отклонение площади этого пика можно оценить только ориентировочно, так как $\%RSD = 58/1,5 + 0,30 \approx 39 \%$. Это указывает на то, что требование $S/N \geq 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС в отдельных случаях может оказаться недостаточным для надежного определения содержания примесей. Наоборот, при отсутствии пиков примесей, выходящих после пика основного вещества, требование $S/N \geq 10$ может оказаться избыточно жестким.

² Под уровнем концентрации понимается концентрация относительно испытуемого раствора, выраженная в процентах.

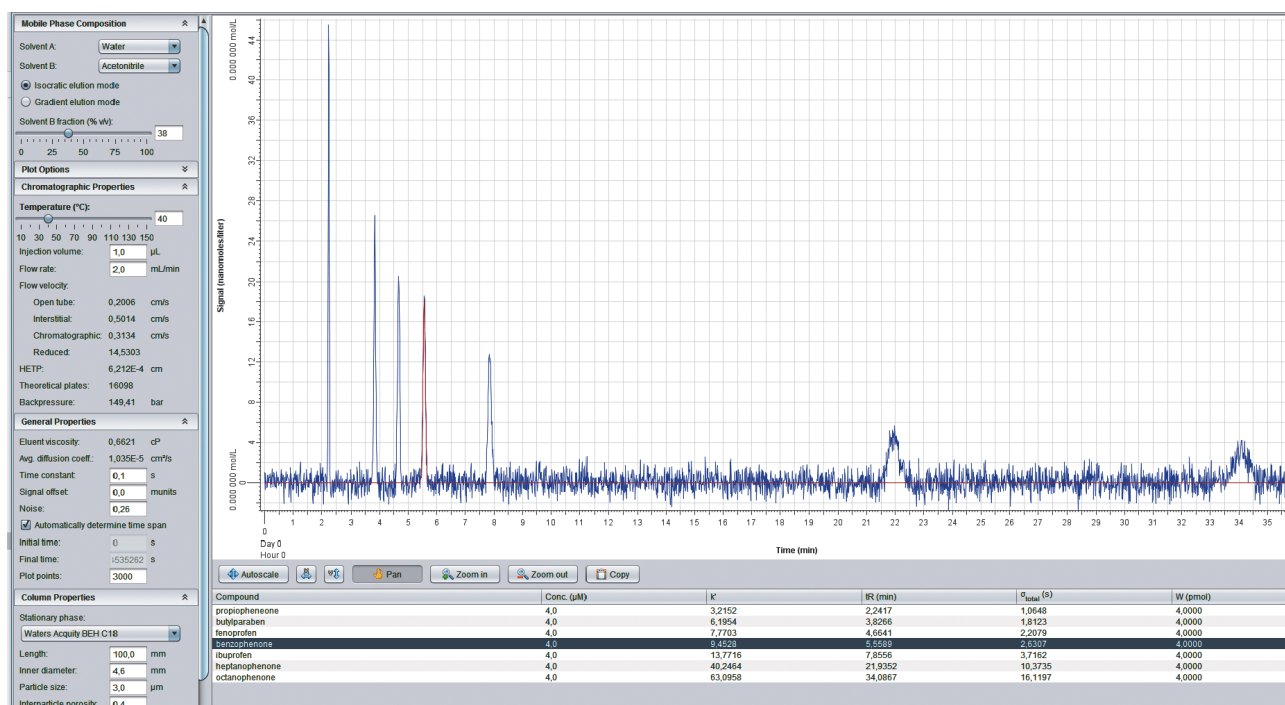


Рис. 1. Хроматограмма смеси: пропиофенона (2,2 мин), бутилпарабена (3,8 мин), фенопрофена (4,7 мин), бензофенона (5,6 мин; $S/N \approx 10$), ибупрофена (7,9 мин), гептанофенона (21,9 мин) и октанофенона (34,1 мин; $S/N \approx 1,5$)

Особенно четко возможность использования значений $S/N < 10$ для раствора ПЧХС проявляется в случае идентифицированных примесей, определяемых по отдельной методике, когда пик примеси выходит до пика основного вещества. Рассмотрим характерный пример из практики. При апробации методики определения энантиомера, полученной от производителя субстанции, было установлено, что на хроматограмме раствора ПЧХС с концентрацией лекарственного вещества ЛВ 0,1 % — на уровне порога игнорирования примеси энантиомера, у пика ЛВ значение $S/N \approx 8$ (рис. 2, а). Формально это было бы недостаточно для раствора ПЧХС. Однако из-за того, что пик энантиомера выходит намного раньше, чем пик ЛВ, при том же содержании энантиомера (0,1 %) его пик (рис. 2, б) имеет $S/N \approx 13$ (!). Так как значение $S/N \approx 13$ превышает требование к пределу количественного определения ($S/N = 10$), это может служить достаточным обоснованием для возможности использования $S/N \geq 8$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. С теоретической точки зрения, значение S/N для раствора ПЧХС может быть даже меньшим: $S/N \geq 6 (10 \cdot (8/13) = 6)$.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА АСИММЕТРИИ ПИКА ОСНОВНОГО ВЕЩЕСТВА НА ХРОМАТОГРАММЕ РАСТВОРА ПЧХС НА ЗНАЧЕНИЕ S/N

В хроматографии концентрацию веществ, как правило, определяют по площадям пиков [15, 16]. Очевидно, что при одинаковой площади (концентрации) высота пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС будет тем меньше, чем больше будет размыт его передний и/или задний фронт, то есть чем больше фактор асимметрии $T_{0,05}$ будет отличаться от единицы. Следовательно, потенциально, одинаковому содержанию примесей на хроматограмме испытуемого раствора в равной степени может соответствовать требование $S/N = 10$ — в случае сим-

метричного пика основного вещества, и $S/N < 10$ — в случае асимметричного пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. В связи с этим представляло интерес оценить, насколько может уменьшиться значение S/N при увеличении асимметрии пика.

Для оценки влияния асимметрии пика на значение S/N для раствора ПЧХС использовали моделирование хроматограмм с помощью специальной компьютерной программы [10]. На рисунке 3 представлены полученные с помощью этой программы изократические хроматограммы смеси шести веществ. Для всех пиков вводили число теоретических тарелок 2000 (вычисляемые по ширине пика на половине его высоты), площадь пика 15000, мертвое время $t_0 = 0,75$ мин. Пик со временем удерживания $t_R = 7,5$ мин рассматривали как аналог пика основного ЛВ на хроматограмме раствора ПЧХС — так как для него отношение $S/N \approx 10$, остальные пики рассматривали как «примеси» на хроматограмме испытуемого раствора. Оценивали влияние фактора асимметрии («tailing factor») пика «основного вещества» на его высоту H и значение S/N . На рисунке 3 продемонстрировано, что при $T_{0,05} = 1,0$ (верхняя хроматограмма) у пика «основного вещества» $S/N \approx 10$, а при $T_{0,05} = 2,0$ (нижняя хроматограмма) $S/N \approx 8$. Для $T_{0,05} = 1,5$ было установлено, что $S/N \approx 9$, то есть в приведенном примере при определении «примесей» эквивалентными являются требования для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС $S/N \geq 10$ при $T_{0,05} = 1,0$, $S/N \geq 9$ при $T_{0,05} = 1,5$ и $S/N \geq 8$ при $T_{0,05} = 2,0$. Следовательно, с теоретической точки зрения, можно было бы обосновать допустимое нижнее значение отношения $S/N < 10$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС при $T_{0,05} \geq 1,5$. Однако снижение требования с $S/N \geq 10$ до $S/N \geq 9$ или 8 слишком мало и, на наш взгляд, не имеет практического значения — в критических случаях целесообразно использовать более

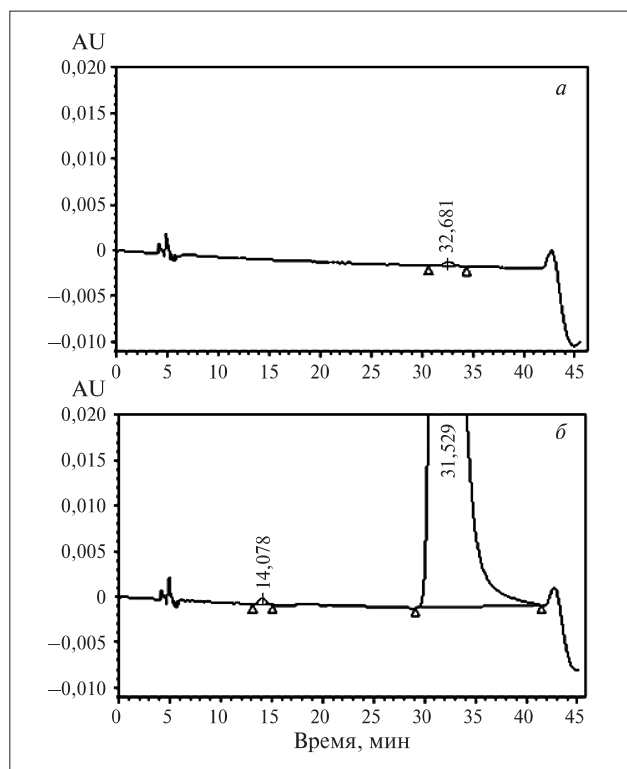


Рис. 2. а — хроматограмма раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (раствор ПЧХС) с концентрацией лекарственного вещества (ЛВ) 0,1 % от концентрации испытуемого раствора; у пика ЛВ (32,7 мин) отношение сигнал/шум $S/N = 8$; б — хроматограмма раствора смеси ЛВ и его энантиомера; концентрация ЛВ — как в испытуемом растворе, а энантиомера — 0,1 % от концентрации испытуемого раствора; у пика энантиомера (14,1 мин) отношение $S/N = 13$

высокое, чем типичное значение порога игнорирования примесей, причем в максимально допустимых пределах, указанных выше.

ВЛИЯНИЕ ПОПРАВочНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ F ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ПРИМЕСЕЙ НА ЗНАЧЕНИЕ S/N ДЛЯ РАСТВОРОВ ПЧХС

Если содержание какой-то идентифицированной примеси определяется не по ее стандартному раствору, а с учетом поправочного коэффициента F , который превышает 1,25, то для раствора ПЧХС контролируемое значение S/N пика основного вещества должно определяться по формуле [4]:

$$S/N \geq F \cdot 10. \quad (4)$$

Если таких примесей несколько, то S/N вычисляют с использованием наибольшего поправочного коэффициента. Например, если содержание примесей определяют методом нормализации площадей пиков с поправочными коэффициентами, и значения F у одной примеси 1,4, а у другой — 2,6, то при хроматографировании раствора ПЧХС требование к отношению S/N должно быть: $S/N \geq 2,6 \cdot 10 = 26$, а не $S/N \geq 10$.

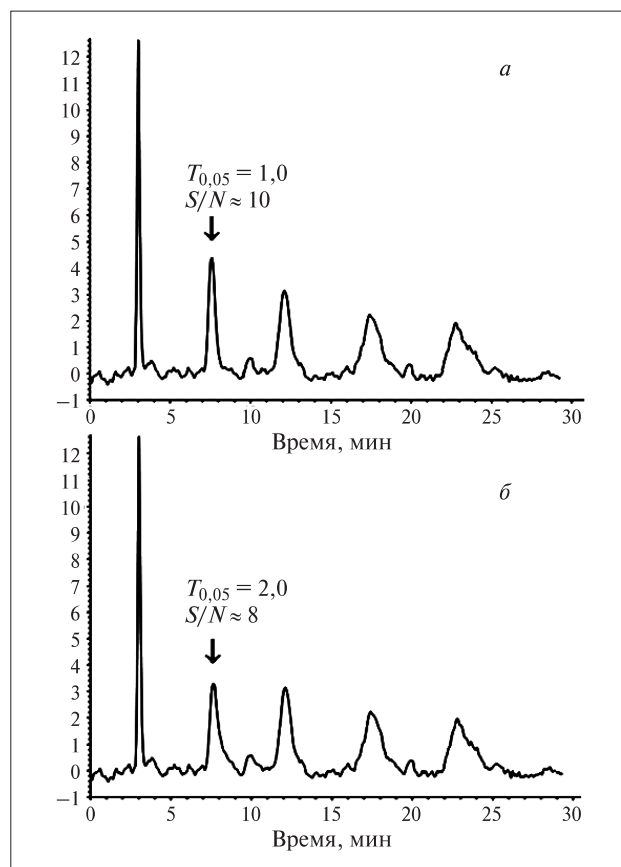


Рис. 3. Модельные хроматограммы для оценки влияния фактора асимметрии на высоту H и отношение S/N пика «основного вещества»; изменяли фактор асимметрии $T_{0,05}$ пика «основного вещества», при этом характеристики всех других пиков — «примесей» — оставались неизменными. При $T_{0,05} = 1,0$ (хроматограмма а) у пика «основного вещества» значение $H \approx 4,4$ и $S/N \approx 10$, а при $T_{0,05} = 2,0$ (хроматограмма б) $H \approx 3,3$ и $S/N \approx 8$

НАЛИЧИЕ И УСЛОВИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ S/N , МЕНЬШИХ 10, В ТРЕБОВАНИЯХ К ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕЕ (Ph. Eur.) И В ФАРМАКОПЕЕ США (USP)

Для растворов ПЧХС может быть обоснована нижняя граница допустимых значений S/N не только выше 10, но и ниже 10. В связи с этим представляло интерес проанализировать монографии Ph. Eur. [2] и USP [9], в которых содержатся требования к отношению S/N , чтобы оценить условия допустимости $S/N < 10$ для методик ВЭЖХ. В результате анализа монографий USP было установлено, что аналогом раствора ПЧХС в USP является «sensitivity solution» (раствор для определения чувствительности). Требования к чувствительности ХС обычно указывают как «signal-to-noise ratio: NLT ... for each peak from the sensitivity solution»³. В Ph. Eur. вместо «sensitivity solution» используют «reference solution» (раствор сравнения) с буквенными обозначениями: например, «signal-to-noise ratio: minimum ... for the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b)».

Анализ более 40 монографий USP [7], в которых нормируется отношение S/N для «sensitivity solution»,

³ NLT — not less than (не меньше, чем).

показал, что только в трех из них $S/N \geq 5$, а в остальных $S/N \geq 10$.

В отличие от USP, в Ph. Eur. [2] сравнительно большое количество монографий с $S/N < 10$ — $\approx 15\%$ [2] от общего количества, в которых нормируется отношение S/N на хроматограмме разбавленного испытуемого раствора с концентрацией, соответствующей уровню заявленного порога игнорирования примесей. Даты версий упомянутых выше монографий — 2008–2017 годы, причем после 2015 года не появлялись новые монографии, в которых $S/N < 10$. В то же время необходимо отметить, что даже в версиях от 2017 года, представляющих собой актуализированные версии монографий, ранее представленных в Ph. Eur., остались прежние требования $S/N < 10$. Хотелось бы отметить, что требование $S/N \geq 10$ в руководстве EDQM «Technical Guide for the Elaboration of Monographs» от 2015 года [4] обосновывалась необходимостью соответствия хроматографической системы главе 2.2.46 Ph. Eur., в которой указано « S/N ratio ≥ 10 at the disregard limit/reporting threshold...» [2]. В более ранней версии аналогичного руководства 2011 года допускалось $S/N \geq 3$: «Signal-to-noise ratio (S/N) is usually determined for a signal that is equal to or greater than the detection limit». Поэтому в Ph. Eur. и в настоящее время в некоторых монографиях остались требования $S/N \geq 3$, ≥ 5 и т.п.

В связи с введением растворов ПЧХС нередко возникает вопрос: «Что делать, если на хроматограмме blank имеется небольшой, переменный по высоте остаточный пик основного вещества?» С проблемой удаления остаточного пика основного ЛВ, появляющегося при хроматографировании blank, сталкивались практически все аналитики при определении примесей в ЛП и фарм субстанциях. До введения требования к ПЧХС эта проблема не стояла остро: чаще всего можно было не обращать внимания на небольшой остаточный пик ЛВ на хроматограмме blank. Однако после введения требований к ПЧХС проблема удаления остаточного пика ЛВ обострилась. На хроматограммах растворов ПЧХС основной пик обычно имеет очень маленькую высоту, и поэтому даже сравнительно небольшой остаточный пик ЛВ может влиять на результат определения S/N . В связи с этим актуальным стал вопрос о допустимой высоте остаточного пика ЛВ на хроматограмме blank. В настоящее время для ответа на это вопрос нет теоретического обоснования. Однако можно воспользоваться критериями допустимого различия содержания примесей (КДР) при трансфере методик, например. На основании собственного опыта автора и данных, приведенных в [18], при трансфере методик КДР всегда $\geq 10\%$, то есть всегда допустимо различие в результатах определения содержания примесей, хотя значения КДР отличаются в разных организациях и могут зависеть от диапазона содержания примесей. Поэтому, по аналогии с трансфером методик определения примесей, можно рекомендовать следующий критерий незначимости остаточного пика ЛВ: максимальная площадь остаточного пика ЛВ на хроматограмме раствора blank не должна превышать 10 % от

площади пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше данные представляют интерес для специалистов, связанных с контролем качества лекарственных субстанций и препаратов. В первую очередь это касается «типичных» и максимально допустимых значений порога игнорирования примесей, учета поправочных коэффициентов и введения критерия незначимости остаточного пика ЛВ. Также следует отметить, что требование к S/N — не менее 10 для растворов ПЧХС, в общем случае, не ставится под сомнение — это дает возможность получать более воспроизводимые и адекватные результаты определения содержания примесей в разных лабораториях и на разных приборах. В то же время показано, что могут быть достаточно весомые доводы для обоснования значения S/N менее 10 для раствора ПЧХС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/femb>.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Frequently Asked Questions about the EDQM and Helpdesk List. Topics: 04. European Pharmacopoeia & International Harmonisation. 01. General Chapters and Monographs. 06. Impurities Chromatography. 05. How to determine the total impurities? Which peaks can be disregarded? Available from: <https://goo.gl/9AfcqH>.
4. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th ed. EDQM. European Pharmacopoeia; 2015. Available from: <https://goo.gl/EVp8kf>.
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances. ICH; 2006.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3B(R2). Impurities in New Drug Products. ICH; 2006.
7. Meyer C, Seiler P, Bies C, Cianciulli C, Watzig H, Meyer VR. Minimum required signal-to-noise ratio for optimal precision in HPLC and CE. *Electrophoresis* 2012; 33(11): 1509–16.
8. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. New York: J. Wiley; 1997.
9. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 39 — NF 34. Rockville; 2016.
10. Kuss H-J, Kromidas S, eds. *Quantification in LC and GC. A practical guide to good chromatographic data*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA; 2009.
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH; 2005.
12. Эпштейн НА. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор). *Химико-фармацевтический журнал* 2004; 38(4): 40–56.
13. Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литтерра; 2008.
14. HPLC Simulator 6.0. Available from: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
15. Meyer VR. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2010.
16. Pauls RE, McCoy RW, Ziegel ER, Wolf T, Fritz GT, Marmion DM. Results of a Cooperative Study Comparing the Precision of Peak Height and Area Measurements in Liquid Chromatography. Part II. *J Chromatogr Sci* 1986; 24(7): 273–7.
17. Commentary USP 39 — NF 34. US Pharmacopoeial Convention. November 2, 2015. Available from: <https://goo.gl/wPovtY>.
18. Chambers D, Kelly G, Limentani G, Lister A, Lung KR, Warner E. Analytical method equivalency: An acceptable analytical practice. *Pharmaceut Technol*. 2005; 29: 64–80.

ОБ АВТОРАХ

Автономное объединение «ШТАДА ФармДевелопмент», АО «НИЖФАРМ». Российская Федерация, 109029, Москва, Автомобильный проезд, д. 6.
Эпштейн Наум Аронович. Начальник центра аналитических исследований, канд. хим. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Эпштейн Наум Аронович; naumepshtein@gmail.com

ON ACCEPTABLE VALUES OF DISREGARD LIMITS FOR IMPURITIES AND SIGNAL-TO-NOISE RATIO WHEN CHECKING CHROMATOGRAPHIC SYSTEM SENSITIVITY

N. A. Epshtein

Autonomous corporation «STADA PharmDevelopment»,
JSC «NIZHPHARM», Avtomobilny passage 6, Moscow 109029, Russian Federation

Abstract: The article provides answers to urgent questions relating to the acceptable values of disregard limits for impurities and signal-to-noise ratio (S/N) when checking the sensitivity of the chromatographic system. It gives recommendations on the «typical» and maximum acceptable values of disregard limits for impurities. The article also demonstrates that the requirement of $S/N \geq 10$ can be unnecessarily rigid in some cases: there could be found convincing arguments justifying a smaller S/N value for the sensitivity solution, for example, in cases when an identified impurity is determined by a specific procedure and the impurity peak appears before the peak of the main substance.

Key words: signal-to-noise ratio; sensitivity solution; disregard limit for impurities; chromatographic system; pharmacopoeia.

For citation: Epshtein NA. On acceptable values of disregard limits for impurities and signal-to-noise ratio when checking chromatographic system sensitivity. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(2): 85–91.

REFERENCES

1. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. I. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Frequently Asked Questions about the EDQM and Helpdesk List. Topics: 04. European Pharmacopoeia & International Harmonisation. 01. General Chapters and Monographs. 06. Impurities Chromatography. 05. How to determine the total impurities? Which peaks can be disregarded? Available from: <https://goo.gl/9AfcqH>.
4. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th ed. EDQM. European Pharmacopoeia; 2015. Available from: <https://goo.gl/EVp8kf>.
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances. ICH; 2006.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3B(R2). Impurities in New Drug Products. ICH; 2006.
7. Meyer C, Seiler P, Bies C, Cianciulli C, Watzig H, Meyer VR. Minimum required signal-to-noise ratio for optimal precision in HPLC and CE. *Electrophoresis* 2012; 33(11): 1509–16.
8. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. New York: J. Wiley; 1997.
9. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 39 — NF 34. Rockville; 2016.
10. Kuss H-J, Kromidas S, eds. *Quantification in LC and GC. A practical guide to good chromatographic data*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA; 2009.
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH; 2005.
12. Epshtein NA. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2004; 38(4): 40–56 (in Russian).
13. Beregovykh VV, ed. *Validation of analytical procedures for drug manufacturers. Guiding principles for drug manufacturers*. Moscow: Litterra; 2008 (in Russian).
14. HPLC Simulator 6.0. Available from: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
15. Meyer VR. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2010.
16. Pauls RE, McCoy RW, Ziegel ER, Wolf T, Fritz GT, Marmion DM. Results of a Cooperative Study Comparing the Precision of Peak Height and Area Measurements in Liquid Chromatography. Part II. *J Chromatogr Sci* 1986; 24(7): 273–7.
17. Commentary USP 39 — NF 34. US Pharmacopeial Convention. November 2, 2015. Available from: <https://goo.gl/wPovtY>.
18. Chambers D, Kelly G, Limentani G, Lister A, Lung KR, Warner E. Analytical method equivalency: An acceptable analytical practice. *Pharmaceut Technol*. 2005; 29: 64–80.

AUTHORS

Autonomous corporation «STADA PharmDevelopment», JSC «NIZHPHARM», Avtomobilny passage 6, Moscow 109029, Russian Federation.
Epshtein NA. Head of the Analytical Research Centre. Candidate of Chemical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Epshtein Naum Aronovich; naumepshtein@gmail.com