

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-5-55-60  
© Н. А. Эпштейн, 2019

Н. А. Эпштейн\*

## ПОПРАВочНЫЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ В ФОРМУЛАХ ДЛЯ РАСЧЕТА СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ: СУЩНОСТЬ, СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ИХ ОГРАНИЧЕНИЯ

Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО "ИРВИН 2", Россия, 115446, Москва, Коломенский проезд, 13А; тел. 8 (903) 2349918.  
\* e-mail: naumepshtein@gmail.com

Представлены формулы для расчета коэффициентов относительной чувствительности  $RRF$  (relative response factors) и поправочных коэффициентов  $F$  (correction factors) примесей, а также формулы, необходимые для понимания сущности коэффициентов  $RRF$  и  $F$ . Рассмотрены основные способы определения поправочных коэффициентов и их ограничения (условия, выполнение которых необходимо для корректного определения  $RRF$  и  $F$ ). Эти ограничения не отражены в Европейской фармакопее и в Фармакопее США, но от их учета зависит правильность определения значений поправочных коэффициентов. Приведены примеры и даны рекомендации для надежного определения и правильного использования поправочных коэффициентов.

**Ключевые слова:** поправочный коэффициент; коэффициент чувствительности; коэффициент относительной чувствительности; примеси; рекомендации.

Определение содержания примесей является одной из основных задач контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. При этом обычно используют расчетные формулы, в которых значение площади пиков идентифицированных примесей умножают или делят на специальные корректирующие коэффициенты, обычно обозначаемые как  $F$  ( $CF$ ) или  $RRF$ . Несмотря на то, что эти коэффициенты уже давно применяются в хроматографических методиках, до сих пор остается актуальной проблема их корректного определения. Более того, встречается неправильное расположение коэффициентов  $F$  ( $CF$ ) и  $RRF$  в расчетных формулах — вместо знаменателя в числителе или наоборот. Подтверждением того, что это не единичные случаи, является публикация, в которой приведена таблица, показывающая, что даже в Фармакопее США в однотипных формулах для определения содержания примесей в разных монографиях множитель  $RRF$  стоит то в числителе, то в знаменателе [1].

Целью статьи было рассмотрение формул, необходимых для понимания сущности коэффициентов  $RRF$  (relative response factor) и  $F$  ( $CF$ ; correction factor), обсуждение основных способов определения поправочных коэффициентов  $F$  и их ограничений — условий, выполнение которых необходимо для корректного определения  $RRF$  и  $F$ , демонстрация примеров и рекомендаций.

Известно, что в нешироком диапазоне концентраций связь между площадью пика  $S$  вещества и его кон-

центрацией  $C$  можно представить в виде линейного регрессионного уравнения [2]:

$$S = bC + a. \quad (1)$$

Значение коэффициента  $b$  (material-specific response factor [3]) определяется свойствами вещества и может существенно отличаться для разных веществ. Учитывая это, а также пренебрегая значением свободного члена линейной зависимости  $a$ , можно выразить коэффициенты  $b$  для примеси и основного вещества из (1) как:

$$b_i = S_i / C_i, \text{ при } a \approx 0, \quad (2)$$

$$b_o = S_o / C_o, \text{ при } a \approx 0, \quad (3)$$

где индекс  $i$  относится к примеси,  $o$  — к основному веществу.

Если обозначить отношение  $b_i$  к  $b_o$ , то есть отношение коэффициентов чувствительности детектора для примеси  $i$  и основного вещества, как  $RRF_i$  и разделить (2) на (3), получим формулу:

$$RRF_i = \frac{b_i}{b_o} = \frac{S_i}{S_o} \cdot \frac{C_o}{C_i}, \quad (4)$$

которая при замене обозначения площади пика  $S$  на  $A$  и индекса  $o$  на  $s$  приводит к аналогичной формуле в европейском руководстве [4]:

$$RRF = \frac{A_i}{A_s} \cdot \frac{C_s}{C_i}, \quad (5)$$

где  $RRF \equiv RRF_i$  — коэффициент относительной чувствительности детектора (relative detector response factor) для примеси  $i$ . В Европейской фармакопее коэффициент  $RRF$  обычно называют “коэффициент чувствительности” (response factor) [5]. Однако на наш взгляд это не совсем удачное название, так как response factor — общепринятое название для коэффициента чувствительности детектора  $b = S/C$  [6]. В связи с этим лучше называть  $RRF$ , как в Фармакопее США, в соответствии с аббревиатурой Relative Response Factor, т.е. “коэффициент относительной чувствительности” [7]. Заметим также, что в формулах для расчета содержания примесей обычно используют не  $RRF$ , а обратную величину:  $F = 1/RRF$ , которая называется “поправочный коэффициент” (correction factor) [5].

Как будет показано ниже, формула (4) является основой для различных способов определения значений  $RRF$  и  $F$ . При ее выводе использовались допущения о линейной зависимости площади пика  $S$  от концентрации  $C$  (формула (1)) и о незначимости отличия свободного члена линейной зависимости  $a$  от нуля ((2) и (3)). Эти два важных допущения (ограничения) необходимо учитывать для корректного определения значений  $RRF$  и  $F$ .

Для того чтобы четко представлять, где должны стоять значения  $RRF$  и  $F$  в формулах для определения концентраций/содержания примесей выразим концентрацию примеси из формулы (4):

$$C_i = \frac{S_i}{RRF_i} \cdot \frac{C_0}{S_0} \quad (6)$$

или

$$C_i = \frac{S_i F_i}{S_0} \cdot C_0 \quad (7)$$

Выражения (7) и (6) дают возможность сделать важный для практики вывод о том, что в формулах для определения концентрации или содержания примесей значение поправочного коэффициента  $F$  всегда должно стоять в числителе, так как площадь пика примеси умножается на  $F$ , а значение коэффициента относительной чувствительности  $RRF$  — в знаменателе, так как площадь пика примеси делится на  $RRF$ .

Рассмотрим **сущность коэффициентов  $RRF$  и  $F$** , а также факторы, которые могут влиять на них на примере УФ-детектора. При  $C_0 = C_i$  из (6) и (7) следует, что  $S_i/RRF_i = S_0$  и  $S_i F_i = S_0$ . Следовательно, коррекция площади пика примеси с использованием коэффициента  $F$  или  $RRF$  означает приведение площади пика примеси к тому значению, которое имела бы площадь пика основного вещества при его концентрации, равной концентрации определяемой примеси.

В области концентраций, в которой выполняется закон Бугера — Ламберта — Бера, коэффициент  $RRF$  можно выразить как [8]:

$$RRF = \frac{M_0 \varepsilon_i}{M_i \varepsilon_0} \quad (8)$$

или

$$F = \frac{M_i \varepsilon_0}{M_0 \varepsilon_i} = \frac{M_0}{M_i} \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon_i} \quad (9)$$

где  $M_i$  и  $M_0$  — молекулярный вес;  $\varepsilon_i$  и  $\varepsilon_0$  — молярные коэффициенты экстинкции примеси  $i$  и основного вещества соответственно. То есть для УФ-детектора поправочный коэффициент  $F$  равен отношению нормализованных (разделенных на молекулярную массу) молярных коэффициентов поглощения основного вещества и примеси.

Из (8) и (9) следует, что на значение  $RRF$  и  $F$  при использовании УФ-детекторов могут влиять те же факторы, что и на молярный коэффициент поглощения  $\varepsilon$  [9]: длина волны  $\lambda$ ; pH (для ионизирующихся молекул); температура; растворитель. Кроме этого,  $RRF$  и  $F$  могут изменяться в рассматриваемом диапазоне концентраций, если в нем не выполняется закон Бугера — Ламберта — Бера для основного вещества и/или для примеси.

Примеры влияния упомянутых выше факторов на значения  $RRF$  примесей приведены в [10]. Для градиентной методики ВЭЖХ установлено, что максимальное изменение  $RRF$  примесей иматиниба составляет: 8,4 % — при изменении температуры на  $\pm 5$  °C; 3,6 % — при изменении скорости потока подвижной фазы на 20 % (изменение скорости потока при градиенте эквивалентно изменению содержания более сильного элюента [6]); 3,2 % — при изменении pH буфера на  $\pm 0,2$  pH. В то же время изменение концентрации буфера на  $\pm 10$  %, замена детектора UV на PDA, а также небольшое изменение длины волны детектора — на  $\pm 3$  нм практически не влияло на значения  $RRF$  примесей иматиниба.

## Способы определения поправочных коэффициентов

### Общие сведения

Согласно европейскому руководству [4], для расчета  $RRF$  “можно использовать среднее отношение площадей во всем диапазоне линейности или отношение наклонов соответствующих уравнений регрессии линейности”; то есть для расчета значения  $RRF$  примеси можно использовать в формуле (4) среднее значение отношения  $S_i/S_0$  или отношение  $b_i/b_0$  во всем диапазоне линейности. Измерения должны проводиться при заданной длине волны и скорости потока. В формулах для определения содержания примесей можно не учитывать поправочные коэффициенты  $F$ , если они находятся в пределах от 0,8 до 1,25, или коэффициенты <относительной> чувствительности  $RRF$ , если они находятся в пределах от 1,2 до 0,8”. Не рекомендуется использовать поправочные коэффициенты, которые имеют значения больше 5. Это можно объяснить тем, что при  $F > 5$  обычно возникают проблемы с детектированием примеси и/или с воспроизводимостью пло-

щадя ее пика. В таких случаях для определения содержания примеси следует использовать метод внешнего стандарта и образец примеси с известным содержанием основного вещества.

Важное значение для определения  $RRF$  и  $F$  имеет правильный выбор области концентраций растворов примесей и основного вещества для определения площадей пиков. Согласно [4], “концентрация примеси и основного вещества должна быть одного и того же порядка величины и измерения должны проводиться в нескольких точках вокруг концентрации, которая соответствует нормируемому содержанию примеси”.

Площади пиков примесей и основного вещества надо определять с достаточной точностью, а для этого необходимо, чтобы выполнялось требование: относительное стандартное отклонение площади пика  $RSD \leq 5,0\%$  [11].

Основные способы определения поправочных коэффициентов для хроматографических методик основаны на приведенной выше формуле (4).

#### Определение поправочных коэффициентов с использованием отношения наклонов “калибровочных прямых”

Этот способ применяют наиболее часто из-за его простоты и экономии дорогостоящих образцов примесей. Он основан на использовании левой части формулы (4), то есть на определении значения отношения  $b_i/b_0$ . Готовят исходный раствор стандартного образца (СО) основного вещества и исходный раствор примеси. Разводят их таким образом, чтобы получить не менее 5 растворов с концентрацией, охватывающей область от уровня как минимум 2  $LOQ$  (где  $LOQ$  — предел количественного определения основного вещества) или от предела игнорирования примесей [11]; обычно 0,05 %) до уровня, превышающего нормируемое содержание примеси не менее чем в 1,2 раза [12] относительно концентрации испытуемого раствора по методике определения примесей. При этом концентрации основного вещества и примеси на каждом уровне должны быть близкими. Берут 2 или 3 [10] концентрации выше и столько же ниже уровня нормируемого содержания примеси, а также концентрацию, соответствующую нормируемому уровню содержания примеси. Хроматографируют полученные растворы, определяют площади пика основного вещества и примеси, вычисляют регрессионные зависимости площади пика от концентрации:  $S = bC + a$  (“калибровочные прямые”), и затем определяют значения  $RRF_i$  ( $RRF$ ) и  $F_i$  ( $F$ ) в соответствии с левой частью формулы (4):

$$RRF_i = b_i/b_0 = (\text{наклон “калибровочной прямой” для примеси } i) / (\text{наклон “калибровочной прямой” для основного вещества}), \quad (10)$$

$$F_i = 1/RRF_i = b_0/b_i = (\text{наклон “калибровочной прямой” для основного вещества}) / (\text{наклон “калибровочной прямой” для примеси } i). \quad (11)$$

Иногда в качестве нижней границы концентраций при определении поправочных коэффициентов приме-

сей берут предел количественного определения основного вещества ( $LOQ$ ). Однако авторитетное руководство по валидации аналитических методик [2] в разделе, посвященном  $RRF$ , не рекомендует поступать таким образом.

Подчеркнем, что определение  $RRF$  и  $F$  по отношению наклонов “калибровочных прямых” имеет существенное ограничение: для корректного определения  $RRF$  и  $F$  следует подтвердить:

- Линейную зависимость  $S$  от  $C$  для основного вещества и для примеси в области концентраций, применяемых для определения  $RRF$  и  $F$  (см. Примечание 1);

- Незначимость свободного члена  $a$  регрессионной зависимости  $S$  от  $C$  как для основного вещества, так и для примеси (требование формул (2) и (3)). Для этого можно использовать  $t$ -критерий Стьюдента. Значение  $a$  статистически незначимо ( $a \approx 0$ ), если [13]:

$$t_a = \frac{|a|}{SD_a} < t(P, f = n - 2), \quad (12)$$

где  $t_a$  — расчетное значение критерия Стьюдента,  $|a|$  — абсолютное значение свободного члена линейной зависимости площади пика от концентрации,  $SD_a$  — стандартное отклонение значения  $a$ ,  $t(P, f = n - 2)$  — табличное значение критерия Стьюдента при доверительной вероятности  $p = 95\%$ ,  $f$  — число степеней свободы,  $n$  — количество экспериментальных точек на регрессионной прямой.

*Пример.* Для определения поправочного коэффициента примеси лекарственного вещества (ЛВ) готовили исходные растворы из навески ЛВ и навески примеси (с точностью до 0,05 мг); исходные растворы разводили до уровня 1,0, 0,5, 0,25, 0,1 и 0,05 % относительно концентрации испытуемого раствора в методике определения примесей. Полученные растворы хроматографировали, определяли значения площади пика ЛВ и рассматриваемой примеси. Затем строили графики (в Excel) зависимости площади пика от концентрации (рисунок) и определяли коэффициенты регрессионных прямых с использованием линии тренда, уточняли значения этих коэффициентов с помощью функции «=ЛИНЕЙН(диапазон значений Y; диапазон значений X; ИСТИНА; ИСТИНА)» и при этом определяли также значение  $SD_a$ , вычисляли по формуле (12) экспериментальное значение  $t$ -критерия Стьюдента и оценивали незначимость свободного члена регрессионной прямой.

Установлено, что регрессионные уравнения отвечают критериям линейности и имеют следующие характеристики:

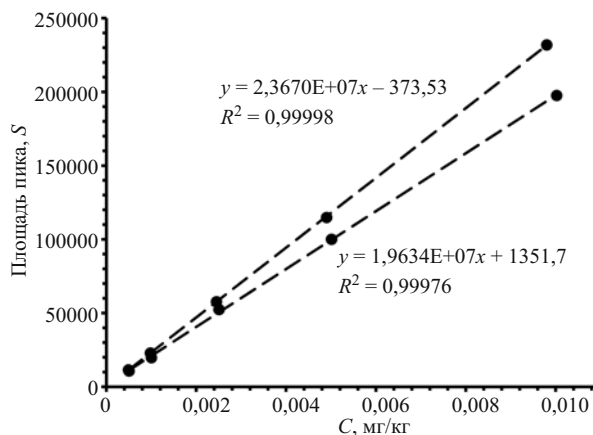
Для примеси:

$$S = 2,3670E7 \cdot C - 373,53; R^2 = 0,99998; SD_a = 311,03;$$

$$t_a = |a|/SD_a = 373,53/311,03 = 1,20.$$

Для ЛВ:

$$S = 1,9634E7 \cdot C + 1351,7; R^2 = 0,99976; SD_a = 901,34;$$



Зависимость площади пика  $S$  от концентрации  $C$ : для примеси — верхняя линия, для  $LB$  — нижняя линия. Уравнения выведены на диаграмму программой Excel.

$$t_a = |a|/SD_a = 1351,7/901,34 = 1,50.$$

Так как полученные значения  $t_a$  меньше табличного значения  $t$ -критерия Стьюдента ( $t(95\%, f=3) = 3,18$ ), то можно использовать формулы (10) и (11) для расчета коэффициента относительной чувствительности  $RRF$  и поправочного коэффициента  $F$ :

$$RRF = (\text{наклон линии для примеси})/(\text{наклон линии для основного вещества}) = 2,367E7/1,9634E7 = 1,21,$$

$$F = \frac{1}{RRF} = \frac{1}{1,21} = 0,85.$$

**Примечание 1.** Для подтверждения линейной зависимости  $S$  от  $C$  при валидации аналитических методов, и в том числе при определении  $RRF$  и  $F$  по отношению наклонов “калибровочных прямых”, чаще всего ограничиваются контролем коэффициента корреляции:  $R \geq 0,999$  — для основных веществ и  $R \geq 0,98$  — для примесей, и визуальной оценкой линейности графика зависимости  $S$  от  $C$  (или  $C$  от  $S$ ). Для более точного подтверждения линейной зависимости целесообразно использовать график остатков в соответствии с рекомендацией ICH [14]. Для построения графика остатков берут концентрации в точках графика  $S$  от  $C$ , вычисляют для каждой из этих концентраций разность между экспериментальным и расчетным (по уравнению регрессии) значением площади пика  $\Delta S$  и строят зависимость  $\Delta S$  от  $C$ . При линейной регрессионной зависимости  $S$  от  $C$  точки на графике остатков не должны проявлять нелинейную тенденцию [2]. “График остатков” можно легко получить в Excel следующим образом. Выбирают вкладку “Данные”, затем “Анализ данных”, в выпадающем меню выбирают строку “регрессия”, “ОК”. В появляющемся окне выбирают значения  $Y$  (площади пиков) и  $X$  (концентрации  $C$ ), ставят галочку в окошке “график остатков”, при необходимости задают область вывода результатов, “ОК”.

## Определение поправочных коэффициентов по расчетной формуле

Поправочный коэффициент  $F_i$  для примеси  $i$  можно выразить в соответствии с уравнением (4) как:

$$F_i = \frac{b_0}{b_i} = \frac{S_0 C_i}{S_i C_0}, \quad (13)$$

где  $S$  — площадь пика,  $C$  — концентрация, индекс “0” относится к основному веществу, а “ $i$ ” — к примеси.

“**Одноуровневый подход**”. Поправочный коэффициент  $F_i$  определяют при такой концентрации раствора примеси и раствора основного вещества, которая соответствует нормируемому содержанию примеси. При этом готовят из отдельных навесок не менее 2 растворов основного вещества и 2 растворов примеси. Хроматографируют эти растворы несколько раз по методике определения примесей и определяют площади пика основного вещества и примесей. Для каждого раствора определяют значение коэффициента  $b$  по формуле:

$$b = S/C. \quad (14)$$

Вычисляют среднее значение коэффициентов  $b_0$  — для основного вещества и  $b_i$  — для примеси, подставляют их в (13) и определяют значение поправочного коэффициента примеси  $i$ :

$$F_i = b_0/b_i. \quad (15)$$

Если в СО основного вещества отсутствует рассматриваемая примесь или ее содержание пренебрежимо мало по сравнению с нормируемым значением, то можно готовить растворы смеси СО основного вещества и примеси из их навесок. При этом сокращается объем экспериментальных работ, и можно для каждого раствора быстро вычислить по хроматограммам отношение площади пика основного вещества  $S_0$  и примеси  $S_i$ , затем — среднее значение  $S_0/S_i$ , подставить его в правую часть формулы (13) и определить значение  $F_i$ . В качестве поправочного коэффициента для примеси  $i$  берут среднее значение  $F_i$  для растворов.

Перед использованием одноуровневого подхода для определения  $F_i$ , следует убедиться в линейной зависимости площади пика от концентрации:  $S = bC + a$ , и в статистической незначимости её свободного члена  $a$  от нуля как для примеси, так и для основного вещества. В отличие от этого, для “многоуровневого подхода” можно ограничиться проверкой только линейности зависимости  $S$  от  $C$ , так как незначимость свободного члена  $a$  будет проявляться в стабильности или в небольшом, допустимом изменении значений  $F_i$  в рассматриваемом диапазоне концентраций.

“**Многоуровневый подход**”. Поправочный коэффициент определяют на таких же уровнях и в такой же области концентраций, что и при использовании отношения наклонов “калибровочных прямых”. При этом для каждого уровня концентраций, а их обычно не меньше 5, определяют значение  $F_i$  как для “одноуров-

невого подхода”. Обычно ограничиваются одним или двумя растворами СО основного вещества и примеси на каждом уровне. При определенных условиях, указанных в предыдущем разделе, можно использовать растворы смеси основного вещества и примесей из их навесок. В качестве поправочного коэффициента берут среднее значение  $F_i$  между всеми уровнями [4].

Для сопоставления рассмотренных выше 3 способов определения поправочных коэффициентов можно использовать результаты, приведенные в литературе [15]. Определяли значения поправочных коэффициентов ( $F$ ) 5 идентифицированных примесей для контроля качества субстанции Clematichinenoside с использованием градиентной методики ВЭЖХ. Готовили и хроматографировали растворы смесей основного вещества и примесей на 5 уровнях концентраций, значительно превышающих пределы количественного определения (LOQ) примесей и основного вещества. Значения  $F$  определяли с использованием “многоуровневого подхода”, который является наиболее надежным, и линейных зависимостей  $S$  от  $C$  (формулы (10) и (11)). Результаты, полученные в [15], систематизированы в таблице. Из нее можно сделать следующие выводы:

– При изменении концентрации примеси значение поправочного коэффициента  $F$  может увеличиваться, уменьшаться или оставаться почти постоянным в зависимости от химической структуры примеси.

– Подтвердилась важность проверки статистической незначимости свободного члена  $a$  регрессионной зависимости  $S$  от  $C$  для примеси и основного вещества. Как видно из таблицы, наибольшее различие  $\Delta$ , % между результатом определения  $F$  по наклонам линейных зависимостей  $S$  от  $C$  и средним результатом определения  $F$  с помощью “многоуровневого подхода” было у примеси 2 — около 11 % и у примеси 4 — около 9 %. Именно у этих примесей наблюдали “большие значения пересечений с осью абсцисс” [15], то есть большие значения свободного члена  $a$  в уравнении регрессии, а это, как указано выше, является препятст-

вием для корректного определения  $F$  по наклонам линейных зависимостей  $S$  от  $C$ .

– Полученные результаты указывают на то, что в общем случае “одноуровневый подход” является наименее ненадежным для определения значений поправочных коэффициентов примесей.

### Определение поправочных коэффициентов примесей без использования СО

У хемиллюминесцентного детектора азота (CLND) для большинства азотсодержащих веществ сигнал (отклик) пропорционален количеству молей азота в молекуле вещества и почти не зависит от его химической структуры (исключением являются молекулы с  $-N=N-$  и  $N-N$  группами) [16]. Это дает возможность определять значения  $RRF$  примесей типа аминов, амидов, азотсодержащих гетероциклов для УФ-детекторов без использования СО по формуле [16, 17]:

$$RRF = \frac{\left( \frac{UV \text{ peak area}}{CLND \text{ peak area}} \right)_i \cdot \frac{MW_i}{(N_2)_i}}{\left( \frac{UV \text{ peak area}}{CLND \text{ peak area}} \right)_0 \cdot \frac{MW_0}{(N_2)_0}}, \quad (16)$$

где  $UV \text{ peak area}$  и  $CLND \text{ peak area}$  — площадь пика при использовании УФ-детектора и хемиллюминесцентного детектора азота, соответственно;  $MW$  — молекулярный вес,  $(N_2)$  — число “молекул азота” в брутто-формуле вещества, индекс  $i$  относится к примеси, а 0 — к основному веществу. Однако следует относиться с осторожностью к использованию хемиллюминесцентных детекторов для определения значений  $RRF$  примесей. Помимо того, что в составе подвижной фазы должны отсутствовать азотсодержащие вещества и нелетучие соли, необходимо знать и учитывать ряд других факторов, иначе можно получить большие ошибки в значении  $RRF$  [17, 18].

### Проверка необходимости определения и учета поправочных коэффициентов

Для методик определения примесей целесообразно проверять, нет ли среди примесей тех, у которых коэф-

### Зависимость экспериментальных значений поправочных коэффициентов $F$ примесей иматиниба от их концентрации и способа определения $F$ [15]

Показатель	Примесь 1	Примесь 2	Примесь 3	Примесь 4	Примесь 5
	$F_1$	$F_2$	$F_3$	$F_4$	$F_5$
<b>Определение поправочного коэффициента с использованием “многоуровневого подхода”, формула (13)</b>					
Среднее значение $F_i$	1,00	1,13	1,00	0,90	0,61
Наличие закономерного изменения $F_i$ при изменении концентрации ( $C$ ) примеси	Уменьшение $F_i$ при уменьшении $C$ : 1,03 → 0,96	Увеличение $F_i$ при уменьшении $C$ : 1,12 → 1,15	Нет закономерности в изменении $F_i$ : 0,99 – 1,02	Первые 3 точки $F_i$ до 0,94 при уменьшении $C$	Нет закономерности в изменении $F_i$ : 0,60 – 0,63
Различие между наибольшим и наименьшим значением $F_i$ , %	7	4	1,5	5	5
<b>Определение поправочного коэффициента с использованием отношения наклонов калибровочных прямых, формула (11)</b>					
Значение $F_i$	1,00	1,01	0,95	0,82	0,59
<b>Различие между результатом определения <math>F_i</math> с использованием “многоуровневого подхода” (<math>F_M</math>) и отношения наклонов калибровочных прямых (<math>F_L</math>): <math>\Delta</math>, % = <math>(F_M - F_L) \cdot 100 / ((F_M + F_L) / 2)</math></b>					
$\Delta$ , %	0	11	5	9	3

коэффициент  $F$  существенно отличается от единицы. Для этого можно, например, использовать диодно-матричный детектор и оценивать изменение отношения высоты пика примеси ( $h_{\text{imp}}$ ) к высоте пика основного вещества ( $h_{\text{drug}}$ ) при изменении длины волны на хроматограмме испытуемого раствора. Хроматографируют испытуемый раствор образца субстанции или ЛВ на конце срока годности (ускоренное или долгосрочное хранение) или используют хроматограммы, полученные при стрессовых исследованиях в ходе валидации методики определения примесей [19]. На хроматограмме изменяют длину волны и сравнивают значение отношения  $(h_{\text{imp}}/h_{\text{drug}})_{\text{method}}$  при длине волны по методике определения примесей (рабочей длине волны) с аналогичным показателем при измененной длине волны  $\lambda$  —  $(h_{\text{imp}}/h_{\text{drug}})_{\lambda}$ . Программы обчета данных в современных хроматографах позволяют это быстро сделать перемещением ползунка длин волн. При такой процедуре обычно достаточно использовать диапазон длин волн от 200 до 350 нм. В качестве критерия необходимости введения поправочного коэффициента для примеси можно рассматривать различие между  $(h_{\text{imp}}/h_{\text{drug}})_{\text{method}}$  и  $(h_{\text{imp}}/h_{\text{drug}})_{\lambda}$  в 5–10 раз [2]. Эта процедура дает также возможность обнаружить примеси, которые не детектируются при рабочей длине волны; заметим, что такие примеси можно обнаружить и при сравнении хроматограммы испытуемого раствора при рабочей длине волны с хроматограммой типа MaxPlot Waters [20]. При обнаружении пиков, которые не видны при рабочей длине волны, следует аналогичным образом с использованием хроматограмм blank и плацебо проверить, не являются ли они системными пиками или пиками плацебо.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lokesh Bhattacharyya, Horacio Pappa, Karen A. Russo, et al., *Pharmacopeial Forum*, **31**(3), 2–8 (2005).

2. Й. Эрмер, Д. Х. МакБ. Миллер, *Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик*, ВИ-АЛЕК, Москва (2013).
3. *Quantification in LC and GC. A practical guide to good chromatographic data*, H.-J. Kuss, S. Kromidas (eds.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim (2009), p. 221.
4. *Technical Guide for the Elaboration of Monographs*, EDQM, European Pharmacopoeia (2015), pp. 25–26, 32.
5. *European Pharmacopoeia*, 9<sup>th</sup> ed., Chapter 2.2.46, Chromatographic Separation Techniques (2017).
6. L. R. Snyder, J. J. Kirkland., J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, J. Wiley, New Jersey (2010), p. 521.
7. *The United States Pharmacopoeia*, <621> Chromatography, USP39-NF34 (2016).
8. Kazunori Sasaki, Tomoyuki Oki, Toru Kobayashi, et al., *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **78**(12), 2073–2080 (2014).
9. В. М. Пешкова, М. И. Громова, *Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии*, И. П. Алимарина (ред.), Высшая школа, Москва (1976).
10. V. K. Chakravarthy, G. K. Babu, R. L. Dasu, et al., *Rasayan J. Chem.*, **4**(4), 919–943 (2011).
11. Н. А. Эпштейн, *Ведомости НИЦЭСМП*, **7**(2), 85–91 (2017).
12. *Validation of analytical procedures, Establishment (handling and characterization) of reference standards in the testing of medical products*, В. А. Н., Bonn (2009), p. 76.
13. К. Дерффель, *Статистика в аналитической химии*, Мир, Москва (1994), с. 177.
14. *International Conference on Harmonization (ICH) Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Geneva (2005).
15. Yang Zhou, Yue Guan, Ji Shi, et al., *Chem. Central J.*, **6**(150), 1–11 (2012).
16. M. A. Nussbaum, S. W. Baertschi, P. J. Jansen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27**(6), 983–993 (2002).
17. André Koelewijn, *The Applicability of Universal Detection in the Pharmaceutical Industry*, University of Amsterdam, Amsterdam (2014).
18. X. Liang, H. Patel, J. Young, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**(4–5), 723–730 (2008).
19. Н. А. Эпштейн, *Разработка и регистрация лек. средств*, **3**(16), 54–68 (2016).
20. *Waters 2998 Photodiode Array Detector Operator's Guide*. Waters Corporation (2010).

Поступила 30.07.18

## CORRECTION FACTORS IN THE FORMULAS FOR CALCULATIONS OF IMPURITIES CONTENT: THE ESSENCE, METHODS OF DETERMINATION AND THEIR LIMITATIONS

N. A. Epshtein

Center for Registration and Development of Medicines LLC "IRVIN 2", Moscow, 115446 Russia

\* e-mail: naumepshtein@gmail.com

This article presents formulas for the calculation of relative response factor (RRF) and correction factor  $F$  of impurities as well as the formulas necessary for understanding the essence of RRF and  $F$  coefficients. The main methods of determining the correction factors and their limitations are considered, including the conditions that are necessary for the correct determination of RRF and  $F$ . These limitations are reflected neither in the European Pharmacopoeia nor in the USP, but taking them into consideration influences correct determination of the values of the correction coefficients. This article includes examples of  $F$  value calculation and gives recommendations for reliable determination and proper use of the correction factors.

**Keywords:** correction factor; response factor; relative response factor; impurities; recommendations.