

## Приклад 9

### Валідація методик визначення залишкових кількостей моксифлоксацину гідрохлориду в промивних водах і на поверхні обладнання після очистки

#### Об'єкт дослідження

Аналітичні методики визначення залишкових кількостей моксифлоксацину гідрохлориду в промивних водах і на поверхні обладнання після очистки. Методики використовуються при проведенні процедур валідації очищення технологічного обладнання і призначені для контролю залишкових кількостей моксифлоксацину гідрохлориду в пробах промивних вод на рівні не більше  $2,35 \cdot 10^{-5}$  г/л і на поверхні обладнання на рівні не більше  $8 \cdot 10^{-7}$  г на  $1 \text{ дм}^2$ .

#### П.9.2. Методики аналізу, що валідуються

Визначення моксифлоксацину гідрохлориду проводять методом ВЕРХ, методики мають однакові умови хроматографування і різну концентрацію розчинів порівняння. Таким чином, валідаційні дослідження мають бути проведені в різних діапазонах концентрації цільового аналіту.

##### П.9.2.1. Визначення вмісту моксифлоксацину гідрохлориду в пробах промивних вод

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Промивна вода.

*Розчин порівняння.* Близько 47 мг (точна наважка) СЗ моксифлоксацину гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 40-50 мл рухомої фази, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки і перемішують. 1.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують. 1.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують (0,0235 мкг/мл).

*Колонка:*

- розмір: 0.15 м x 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель для хроматографії октилсилільний Р (5 мкм);
- температура: 30 °С;

*Рухома фаза:* 0,1 М фосфатний буферний розчин ацетонітрил для хроматографії Р (74:26);

*Швидкість рухомої фази:* 1.0 мл/хв;

*Детектування:* спектрофотометрично за довжини хвилі 296 нм.

*Об'єм інжекції:* 50 мкл;

*Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:*

- коефіцієнт симетрії піка моксифлоксацину не більше 1.5;
- ефективність колонки за піком піку моксифлоксацину на менше 4000 т.т.

Поперемінно хроматографують декілька разів випробуваний розчин і розчин порівняння. Для хроматограм розчину порівняння розраховують відносне стандартне відхилення ( $RSD_0$ ) за площами піку моксифлоксацину. Кількість інжекцій ( $n_0$ ) вважається достатньою, якщо  $RSD_0$  не перевищує граничне значення ( $RSD_{max}$ ), наведене в таблиці:

$n_0$	2	3	4
$RSD_{max}$	0.82 %	2.1 %	3.0 %

Вміст моксифлоксацину гідрохлориду в промивній воді не має перевищувати 0.0235 мкг/мл (не більше  $2.35 \times 10^{-5}$  г/л).

Примітка: Приготування 0,1 М фосфатного буферного розчину.

13.6 г калію дигідрофосфату *P* поміщають в хімічну склянку місткістю 1000 мл, розчиняють в 900 мл *води* для хроматографії *P*, доводять рН розчину до  $3.0 \pm 0.1$ , розчин переносять в мірну колбу місткістю 1000 мл, доводять об'єм розчину *водою* для хроматографії *P* до позначки, перемішують і фільтрують під вакуумом крізь мембранний фільтр з діаметром пор не більше 0.45 мкм.

### **П.9.2.1. Визначення вмісту моксифлоксацину гідрохлориду на 1 дм<sup>2</sup> поверхні обладнання**

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Трафарет з плівки ПВХ (полівінілхлориду) з зовнішнім розміром 15 × 15 см і внутрішнім квадратним вирізом 10 × 10 см (100 см<sup>2</sup>) притуляють до внутрішньої поверхні технологічного обладнання. Робочий кінець аплікатора змочують 0.5 мл *метанолу P*, притуляють поверхню аплікатора до обладнання всередині квадрата в верхньому лівому кутку і, не відриваючи аплікатор від поверхні обладнання, переміщують його в правий верхній кут. Далі опускають аплікатор до межі попередньої обробки і повторюють операцію поки не буде задіяна вся поверхня всередині квадрата. Повторюють обробку зворотною поверхнею аплікатора, на цей раз рухаючись

згори донизу всередині квадрата. Аплікатор поміщають в шийку мірної колби місткістю 20 мл і промивають робочі поверхні порціями по 1 мл метанолу Р для кожної поверхні, віджимають аплікатор об шийку колби, повторюють обробку поверхні обладнання всередині квадрата, як зазначено вище і промивають в ту ж колбу робочі поверхні аплікатора, спочатку по 1 мл метанолу Р для кожної поверхні, а після, порціями по 5 мл рухомої фази. Доводять об'єм одержаного розчину рухомою фазою до позначки, перемішують і фільтрують крізь мембранний фільтр з політетрафторетилену з діаметром пор 0.45 мкм.

*Розчин порівняння.* Близько 80 мг (точна наважка) СЗ моксифлоксацину гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 70-80 мл рухомої фази, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки і перемішують. 1.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки і перемішують. 1.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки і перемішують (0.04 мкг/мл).

Далі діють як зазначено в методиці визначення моксифлоксацину гідрохлориду в пробах промивних вод.

Вміст моксифлоксацину гідрохлориду на 1 дм<sup>2</sup> поверхні технологічного обладнання не має перевищувати  $8 \times 10^{-7}$  г.

### П.9.3. Валідаційні характеристики і критерії прийнятності

Вивченню підлягають ті самі валідаційні характеристики, що й під час валідації методик визначення супровідних домішок (див. Розділи 4,5 і Приклад 2): специфічність, робасність, лінійність, прецизійність, правильність, межа кількісного визначення та межа виявлення, внутрішньолабораторна прецизійність, придатність хроматографічної системи (для ВЕРХ-методик). Для методики контролю залишкових кількостей препарату на поверхні додатково вивчається ступінь вилучення, інші характеристики вивчають без знімання моксифлоксацину з поверхні.

*Невизначеність результатів кількісного або граничного випробування* на вміст залишкових кількостей препарату ( $\Delta_{As}$ ), виражена як односторонній довірчий інтервал для ймовірності 95%, має задовольняти співвідношенню (див. Розділ 12):

$$\text{Граничні випробування:} \quad \max \Delta_{As} \leq 16\% \quad (\text{П.9.1})$$

$$\text{Кількісні випробування:} \quad \max \Delta_{As} \leq 5\% \quad (\text{П.9.2})$$

де  $\max \Delta_{As}$  – максимально допустима невизначеність результатів аналізу.

*Нормалізовані координати* розраховують за співвідношеннями (4.1) Розділу 4. Для одержання нормалізованих координат  $X_i$  замість  $C_{st}$  використовують гранично допустиму концентрацію моксифлоксацину гідрохлориду, тобто концентрацію модельних розчинів виражають у відсотках до ГДК. Для приготування модельних розчинів використовують наважку моксифлоксацину гідрохлориду, яка забезпечує точність значення «введено» на рівні  $(\pm 0.1 \times \max \Delta_{As})\%$  від ГДК.

*Діапазон* (см. п. *a.b* розділу 5): 30 – 150 % в нормалізованих координатах;  $g = 9$  точок. Такий діапазон запропонований тому, що для валідації методик визначення залишкових кількостей АФІ необхідно продемонструвати, що у ході послідовних циклів очищення концентрація аналіту зменшується. Тобто бажано, щоб методика мала досить широкий діапазон зі сторони високих концентрацій. Однак для дуже широкого діапазону можуть не виконуватися вимоги щодо критеріїв прийнятності. Тому методика була валідована для верхньої межі діапазону 150 %. Нижня границя діапазону є не нижче ніж  $\max QL$ .

### П.9.3.1. Специфічність

Для підтвердження специфічності може бути показано наступне:

- 1) На хроматограмах плацебо (вода) відсутні піки, час утримування яких збігається з часом утримування піків моксифлоксацину на хроматограмах розчину порівняння.
- 2) На хроматограмах модельного розчину 100% і розчину порівняння препарату пік моксифлоксацину відділяється від системних піків до базової лінії, коефіцієнт поділу не менше 1.2.
- 3) Пік моксифлоксацину на хроматограмах модельного розчину 100% і розчину порівняння є спектрально чистим (кут показника спектральної чистоти не перевищує граничного значення, розрахованого для даної хроматограми програмним забезпеченням хроматографа).

### П.9.3.2. Робасність

- 1) Проводять вивчення стабільності розчинів. Розчини вважають стабільними, якщо відхилення відношення «знайдено / введено» від 100% ( $\Delta_{Time}$ ) в модельному розчині і в розчині порівняння, проаналізованих через інтервал часу, для якого підтверджується стабільність, не перевищує значення  $\max \Delta_{As}$ , тобто  $|\Delta_{Time}| \leq 5\%$ .

Результати вивчення стабільності розчинів надані в Таблиці П.9.1.

Таблиця П.9.1.

**Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину та розчину порівняння**

	Хроматограма	Площа моксифлоксацину.	«Знайдено/введено»	Відхилення від 100 %
Промивні води	Свіжоприготований розчин порівняння	3185	-	-
	Розчин порівняння, 24 год	3144	98.7	-1.3
	Модельний розчин 90 %, 24 год	2874	100.3	0.3
Поверхня	Свіжоприготований розчин порівняння	13023	-	-
	Розчин порівняння, 24 год	13020	99.9	-0.1
	Модельний розчин 90 %, 24 год	12551	96.4	-3.6
<b>Вимога:</b> (кількісне випробування)				<b>≤ 5%</b>
<b>Висновок:</b>				<b>Витримуються</b>

2) Досліджують вплив на хроматографічну систему невеликих змін в умовах аналізу, які задаються аналітиком: співвідношення органічної і водної складових рухомої фази (ацетонітрилу і 0.1 М фосфатного буферного розчину), рН рухомої фази, температури колонки. Критерії прийнятності такі самі, як п.2 і п.3. при вивченні специфічності.

Дослідження проводять на модельному розчині 100%. Варіювання умов хроматографування проводять відповідно до вимог ДФУ (2.2.46. Методи хроматографічного розділення) таким чином:

- температуру колонки варіювали в межах 30 (± 10) °С
- рН рухомої фази варіювали в межах ±0.5 від рН рухомої фази
- вміст ацетонітрилу в рухомій фазі варіювали в межах (± 2 % абсолютних (26 % ± 2 %)).

Таблиця П.9.2

#### Варіювання умов хроматографування

	Температура	рН	Ацетонітрил
програма “+”	40 °С	3.5	28%
програма “ ”	30 °С	2.5	24%

Таблиця П.9.3

**План проведення експерименту по дослідженню робастності**

№ досліду	Температура	pH	Ацетонітрил
1	+	+	-
2	+	+	+
3	-	+	+
4	-	+	-
5	-	-	-
6	-	-	+
7	+	-	+
8	+	-	-

В кожному досліді одержували по 2 паралельні хроматограми.

Результати дослідження стійкості методики (визначення моксифлоксацину в промивних водах) до невеликих змін, що задаються аналітиком, надані в Таблиці П.9.4.

Таблиця П.9.4.

**Результати дослідження стійкості хроматографічної системи**

Хроматограма	AcCN %	pH	Темп. °C	Rs <sub>ср.</sub>	Кут показника спектральної чистоти, середнє для 2 паралельних хроматограм	
					Рез.	Крит.
Moxifloxacin_Robust_+/-_ModSol	28	3.5	30	>>1.2	3.906	4.405
Moxifloxacin_Robust_+/_ModSol	28	3.5	40	>>1.2	3.035	4.207
Moxifloxacin_Robust_-/_ModSol	24	3.5	40	>>1.2	1.969	3.307

Moxifloxacin_Robust_-/+/_ _ModSol	24	3.5	30	>>1.2	2.184	3.579
Moxifloxacin_Robust_-/-/_ _ModSol	24	2.5	30	>>1.2	2.205	3.472
Moxifloxacin_Robust_-/_ /+_ModSol	24	2.5	40	>>1.2	2.250	3.663
Moxifloxacin_Robust_+/_ /+_ModSol	28	2.5	40	>>1.2	2.385	3.734
Moxifloxacin_Robust_+/_/_ _ModSol	28	2.5	30	>>1.2	3.191	4.995
Вимога: $R_s \geq 1.2$				>1.2		
Вимога: кут показника спектр. чистоти < граничного значення					< граничного значення	
Висновок:				Витримуються		

3. Аналізують модельний розчин 100% на іншій колонці в умовах методики.

Відношення «знайдено / введено» на іншій колонці не має відхилитися від 100% більше, ніж на  $max\Delta_{As}$ .

### П.9.3.3. Ступінь вилучення

Ступінь вилучення моксифлоксацину з поверхні обладнання має бути не менше 80%. Ступінь вилучення характеризується систематичною похибкою ( $\delta$ ):

$$\delta = |Z_{mean} - 100|,$$

$$\delta \leq 20\%.$$

де:

$Z_{mean}$  – середня визначена кількість моксифлоксацину, у відсотках, до введеної на поверхню обладнання.

Якщо дані вимоги не витримуються, внесок невизначеності при вивченні ступеня вилучення враховують при оцінці невизначеності результатів аналізу.

**Опис процесу.** На поверхню (1 дм<sup>2</sup>), що імітує поверхню технологічного обладнання, наносять моксифлоксацину гідрохлориду у кількості, що дорівнює ГДК. Проводять вилучення з поверхні і визначення моксифлоксацину гідрохлориду відповідно до методики. Нанесення на поверхню, вилучення і визначення проводять 6 разів. Хроматографують двічі кожен випробуваний розчин і розчин порівняння в умовах методики визначення.

Результати вивчення ступеня вилучення моксифлоксацину з поверхні обладнання представлені в таблиці П.9.5.

Таблиця П.9.5

**Результати вивчення ступеня вилучення моксифлоксацину з поверхні обладнання**

Хроматограма	Середня площа піка моксифлоксацину	Знайдений вміст моксифлоксацину від введеного, %	Систематична похибка ( $\delta$ ), %
Moxifloxacin_Extract_RefSol	13633	-	<b>8.9</b>
Moxifloxacin_Extract_1_ModSol	11436	83.9	
Moxifloxacin_Extract_2_ModSol	13235	97.1	
Moxifloxacin_Extract_3_ModSol	13516	99.1	
Moxifloxacin_Extract_4_ModSol	11752	86.2	
Moxifloxacin_Extract_5_ModSol	11905	87.3	
Moxifloxacin_Extract_6_ModSol	12722	93.3	
<b>Вимоги:</b>			<b><math>\leq 20</math></b>
<b>Висновок:</b>			витримуються

Методика визначення має достатній ступінь вилучення, коригування результатів визначення не потрібно.

**П.9.3.4. Лінійність. Збіжність і правильність.**

Оцінка лінійності, збіжності, правильності проводиться відповідно до схеми та критеріїв прийнятності, що описані в розділі 4.4.3.

Лінійність методики визначення залишкових кількостей моксифлоксацину гідрохлориду досліджували в діапазоні концентрацій 30 - 150% від (ГДК) моксифлоксацину гідрохлориду. Дев'ять модельних розчинів: 30%, 30%, 60%, 60%, 90%, 120%, 120%, 150% і 150% від гранично допустимої концентрації моксифлоксацину аналізували в умовах методики.  $SD_{range} = 47.43\%$  (розраховується за формулою 4.3).

Залишкове стандартне відхилення лінійної залежності ( $SD_0$ ) має задовольняти співвідношенню:



**Граничні випробування:**  $SD_o(\%) \leq \max \Delta_{As}(\%) / t(95\%, g - 2) =$   
 $= 16 / 1.89 = 8.4\%$  (П.9.3)

**Кількісні випробування:**  $SD_o(\%) \leq \max \Delta_{As}(\%) / t(95\%, g - 2) =$   
 $= 5 / 1.89 = 2.6\%$  (П.9.4)

*Коефіцієнт кореляції (R<sub>c</sub>)* має задовольняти співвідношенню

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{SD_o^2}{SD_{range}^2}} \quad (\text{П.9.5})$$

*Вільний член прямої (a)* оцінюється на двох рівнях: статистичної та практичної незначущості, та має задовольняти співвідношенням (4.17-4.18).

*Збіжність (z)* оцінюється за стандартним відхиленням відношення «знайдено»/«введено» та має задовольняти співвідношенню:

$$\Delta_Z = s_Z(\%) \times t(95\%, g - 1) \leq \max \Delta_{As} \quad (\text{П.9.6})$$

де:

*s<sub>Z</sub>* стандартне відхилення, розраховане для відношень «знайдено»/«введено» для всіх розчинів;

*t* однобічний критерій Стьюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи максимально допустима невизначеність методики;

*g* кількість точок у валідаційному експерименті;

*Систематична похибка (δ%)* оцінюється на двох рівнях: статистичної та практичної незначущості (див. Розділ 4.4.2):

**Статистична незначущість:**  $\delta\% = \left| \bar{Z} - 100 \right| \leq \Delta_{\bar{Z}} = \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{g}} = \frac{\Delta_{As}}{3}$  (П.9.7)

$$g = 9$$

**Практична незначущість:**  $\delta(\%) \leq \max \delta = 0.32 \times \max \Delta_{As}$  (П.9.8)

Оцінку лінійності, збіжності і правильності методики розглянуто в **Прикладі 2. Валідація методики контролю супровідних домішок в субстанції цефуроксиму натрієвої солі.**

### П.9.3.5. Межа виявлення і межа кількісного визначення

$DL$  і  $QL$  можуть бути розраховані за результатами дослідження лінійності за формулами (4.19-4.20).

Межа виявлення в нормалізованих координатах має задовольняти співвідношення (5.1–5.2), тобто:

$DL \leq 10\%$  (кількісні випробування);

$DL \leq 32\%$  (граничні випробування).

Межа кількісного визначення в нормалізованих координатах має задовольняти співвідношення (5.3), тобто:

$QL \leq 32\%$  (кількісні випробування).

Оцінку  $DL$  і  $QL$  методики розглянуто в **Прикладі 2. Валідація методики контролю супровідних домішок в субстанції цефуроксиму натрієвої солі.**

Окрім критерію, зазначеного вище, при оцінці  $QL$  можуть бути застосовані такі:

для модельного розчину з концентрацією моксифлоксацину гідрохлориду не більше 32% від ГДК, який досліджується на лінійність, різниця «знайдено% - введено%», виражена у відсотках від ГДК, не має перевищувати  $\max\Delta_{As}$ .

концентрація моксифлоксацину гідрохлориду в розчині, для якого відношення «сигнал / шум (S / N)» становить 10 : 1, не має перевищувати  $QL$ , тобто для модельного розчину з вмістом моксифлоксацину гідрохлориду не більше 32% від ГДК значення «сигнал / шум» має перевищувати 10: 1 (критерій для хроматографічних методик).

### П.9.3.6. Внутрішньолабораторна прецизійність

Для підтвердження внутрішньолабораторної прецизійності може бути виконано і показано наступне: аналізують 100% модельний розчин відповідно до методики визначення в два різних дні, різні аналітики на 2 різних колонках. Дослідження поєднують з вивченням робасності, аналіз на різних колонках.

**Критерій прийнятності.** Відношення «знайдено / введено» не має відхилитися від 100% більше, ніж на  $\max\Delta_{As}$ .