

# Валідація методики контролю супровідних домішок в субстанції цефуроксиму натрієвої солі

## Об'єкт дослідження

Порошок цефуроксиму натрієвої солі (ЦН) для приготування розчину для ін'єкцій.

Під час проведення досліджень використовували препарат і стандартний зразок цефуроксиму натрієвої солі Європейської Фармакопеї. Використовувані реактиви і титровані розчини відповідали вимогам Фармакопеї.

## Аналітичне обладнання

Повірений рідинний хроматограф Agilent 1100 3D LC System фірми Agilent Technologies; повірені ваги AG 204 фірми Mettler Toledo. У дослідженнях використовували мірний посуд класу А (першого класу) фірми Simax, Чехія, який відповідав вимогам Фармакопеї.

### П.2.1. Методика аналізу, що валідується

У розглянутому нами випадку для розрахунку вмісту супровідних домішок використовується ВЕРХ-методика в умовах кількісного визначення цефуроксиму натрієвої солі відповідно до монографії Фармакопеї на субстанцію цефуроксиму натрієвої солі. Ураховуючи специфіку аналізу в кожній конкретній аналітичній лабораторії, Фармакопея дозволяє варіювання зазначених у монографії хроматографічних умов у невеликих межах («*Методи хроматографічного розділення*» (2.2.46)). Якщо варіювання виходить за зазначені межі, необхідно проводити валідацію методики, але не в повному обсязі відповідно до встановлених вимог, а за найбільш критичними валідаційними характеристиками, які відображають реальні зміни.

#### П.2.1.1. Супровідні домішки

Випробування проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог Фармакопеї («*Рідинна хроматографія*» (2.2.29)).

По 50 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння (с), приготованих в розділі «Кількісне визначення», поперемінно хроматографують на рідинному хроматографі з УФ-детектором в умовах, описаних в розділі «Кількісне визначення».

Час хроматографування випробовуваного розчину має бути в чотири рази більший за час утримування основного піка.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка домішки А, а також площа піка будь-якої іншої домішки не має перевищувати площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (не більше 1.0 %); сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати більш ніж у 3.0 рази площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (не більше 3.0 %), не враховуючи піки з площею менше 5 % від площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (0.05 %).

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо виконуються умови перевірки придатності хроматографічної системи, описані в розділі «Кількісне визначення».

### П.2.1.2. Кількісне визначення

Випробування проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог статті «Рідинна хроматографія» (2.2.29).

*Випробовуваний розчин.* Близько 0.04 г (точна наважка) вмісту флакона розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину до 100.0 мл водою Р.

Для випробування «Супровідні домішки» розчин готують безпосередньо перед хроматографуванням.

Для випробування «Кількісне визначення» розчин використовують свіжоприготованим (термін зберігання розчину 6 год).

*Розчин порівняння (а).* Близько 0.04 г (точна наважка) стандартного зразка (СЗ) цефуроксиму натрієвої солі (EP CRS) розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину до 100.0 мл водою Р.

Розчин використовують свіжоприготованим.

*Розчин порівняння (b).* 20 мл розчину порівняння (а) поміщають в водяну баню, попередньо нагріту до температури 80 °С, і витримують протягом 15 хв, після чого негайно охолоджують.

Термін зберігання розчину — 1 доба за температури від 8 °С до 15 °С.

*Розчин порівняння (с).* 1.0 мл випробовуваного розчину доводять до 100.0 мл водою Р.

Розчин використовують свіжоприготованим.

Хроматографують 5 мкл розчину порівняння (b).

По 5 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння (а) хроматографують на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи по 3 хроматограми для кожного з розчинів, за таких умов:

- колонка розмірами 150×4.6 мм, заповнена сорбентом Lichrospher 60 RP-select В з розміром частинок 5 мкм (колонка 1), або аналогічна;

- рухома фаза — суміш *ацетонітрилу P* і ацетатного буферного розчину рН 3.4, отриманого розчиненням 6.01 г *оцтової кислоти льодяної P* і 0.68 г *ацетату натрію P* у воді *P* і доведенням отриманого розчину до 1000.0 мл *водою P* (8:92);
- швидкість рухомої фази — 2 мл/хв;
- детектування — 273 нм;
- температура термостата автосамплера — 10 °С;
- температура термостата колонки — 25 °С.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- ступінь розділення піків, розрахований для двох основних піків цефуроксиму і домішки А цефуроксиму, ~~розрахований~~ з хроматограм розчину порівняння (b), становить не менше 2.0;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для площі піка цефуроксиму з трьох хроматограм розчину порівняння (a), не перевищує 1.30 %;
- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком цефуроксиму на хроматограмах розчину порівняння (a), не менше 2500 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піка, розрахований за піком цефуроксиму з хроматограм розчину порівняння (a), не перевищує 2.0.

У фармакопейну методику були внесені такі зміни:

- Замінений сорбент хроматографічної колонки силікагель гексилсилільний для хроматографії на силікагель октадецилсилільний для хроматографії, що спричинило коригування хроматографічних умов: збільшення вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі.
- Оптимізована пробопідготовка для зменшення невизначеності пробопідготовки, але водночас кількість речовини, що хроматографується, залишилась такою самою, як у монографії ЄФ.
- Встановлена температура термостата автосамплера 10 °С, що пов'язано з нестабільністю цефуроксиму за кімнатної температури і вище (розкладається з утворенням переважно домішки А).

### П.2.1.3. Завдання і валідаційні критерії

Ураховуючи зазначені вище зміни, а також те, що методика визначення супровідних домішок також буде використовуватися для *контролю кількісного вмісту домішок* під час дослідження стабільності препарату, методика вимагає валідації за найбільш критичними валідаційними характеристиками: специфічність, робасність, лінійність, правильність, прецизійність (збіжність),

межа кількісного визначення ( $QL$ ) і межа виявлення ( $DL$ ).

*Нормалізовані координати* розраховували за співвідношеннями (4.1) розділу 4. Для одержання нормалізованих координат  $X_i$  в рівняннях (4.1) замість  $C_{st}$  використовували граничний за специфікацією вміст домішок  $ImL$ , тобто концентрації домішок виражали у відсотках до  $ImL$ .

*Діапазон* (див. п. 5.7 розділу 5): 25–125 % в нормалізованих координатах;  $g = 9$  точок (25, 25, 50, 50, 75, 75, 100, 125, 125 %) і один стандартний розчин (100 %).  $SD_{range} = 38.41$  %.

*Невизначеність результату визначення індивідуальної домішки і суми домішок* ( $\Delta_{Imp}$ ), виражена як однобічний довірчий інтервал для ймовірності 95 %, має задовольняти співвідношення (5.6) розділу 5, тобто має перевищувати 5.0 % від граничного вмісту домішки ( $ImL$ ), що в абсолютних одиницях для вмісту домішки А та іншої індивідуальної домішки становить  $\Delta_{Imp} \leq 0.05$  %, а для суми домішок  $\Sigma \Delta_{Imp} \leq 0.15$  %.

*Систематична похибка* (4.10, 4.12 розділу 4):

$$\delta \leq \Delta_{As} / 3 \text{ (статистична незначущість):}$$

$$\delta \leq 0.32 \times 5.0 = 1.6 \text{ \% (практична незначущість).}$$

*Межа виявлення* в нормалізованих координатах має задовольняти співвідношення (5.2-5.3), тобто  $ПО \leq 10$  %.

*Межа кількісного визначення* в нормалізованих координатах має задовольняти співвідношення (5.2-5.3), тобто  $ПКО \leq 32$  %.

*Залишкове стандартне відхилення* прямої лінії має задовольняти співвідношення (5.9), тобто  $SD_0 \leq 2.6$  % (як для кількісних випробувань).

*Коефіцієнт кореляції*:  $R_c \geq 0.9976$  (див. вимоги (5.11)).

*Вільний член прямої* (5.12-5.13):

$$a \leq 1.89 \times s_a \text{ (статистична незначущість);}$$

$$a \leq 2.1 \text{ \% (практична незначущість).}$$

## **П.2.2. Специфічність і робасність**

### **П.2.2.1. Специфічність**

Використовували підхід, описаний у розділі 5.5.

Готували і піддавали таким «стресовим» впливам випробовуваний розчин: кислотний гідроліз, лужний гідроліз, нагрів, УФ-опромінення.

Хроматографували отримані «стресові» розчини. Для одержання «репрезентативного» розчину змішували в рівних об'ємах «стресові» розчини, отримані під час лужного гідролізу і УФ-опромінення.

Для вибору оптимальних хроматографічних умов хроматографували «репрезентативний» розчин в умовах методики, змінюючи вміст ацетонітрилу від 4 % до 10 %.

У вибраних оптимальних умовах хроматографували «репрезентативний» розчин на другій колонці (колонка 2): розмір  $4.6 \times 150$  мм, заповнена сорбентом Symmetry C-18 з розміром частинок 5 мкм.

### П.2.2.2. Дослідження стабільності розчинів

Час, протягом якого розчини стабільні, має бути достатнім для використання в рутинному аналізі автосамплера хроматографа, тобто має становити не менше 6 год. Для перевірки цього хроматографували випробовуваний розчин відразу після приготування розчину і через 6 год.

Розчин цефуроксиму натрієвої солі є нестабільним, під час гідролізу утворюється домішка А цефуроксиму (дескарбамоїлцефуроксим). Інтенсивне накопичування цієї домішки відзначається вже за кімнатної температури розчину і підвищується з ростом температури. Щоб сповільнити утворення домішки А в розчині, в методику ввели термостатування автосамплера хроматографа за  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (результати — в Табл. П.2.1).

Були також змодельовані «найгірші» хроматографічні умови, які сприяють накопиченню домішки А в розчині (кімнатна температура автосамплера, температура термостатування колонки  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , вміст ацетонітрилу в рухомій фазі 3 %), і отримані результати перевірки стабільності випробовуваного розчину (результати — у Табл. П.2.2).

Із П.2.1.3 маємо:  $\Delta_{Imp} \leq 0.05\%$  абс., а  $\Sigma\Delta_{Imp} \leq 0.15\%$  абс. Відповідно до співвідношення (5.7), під час вивчення стабільності відмінність вмісту індивідуальної домішки від вихідного значення не має перевищувати  $Dif(stab) \leq \sqrt{2} \times 0.05 = 0.07\%$  абс., а для суми —  $\Sigma Dif(stab) \leq \sqrt{2} \times 0.15 = 0.21\%$  абс.

### П.2.3. Модельні розчини, виконання вимірювань і розрахунки

У Табл. П.2.4 наведені теоретичні ( $X_{i\text{ теор.}}$ ) і фактичні величини ( $X_{i\text{ факт.}}$ ) (нормалізовані) вмісту?? цефуроксиму натрієвої солі в модельних розчинах. Модельні розчини і розчин порівняння готували з окремих наважок ваговим методом.

Вимірювання виконували у такому порядку: 3 вимірювання модельного розчину 1; 3 вимірювання модельного розчину 2; 3 вимірювання модельного розчину  $i$ ; 3 вимірювання модельного розчину 9. Між модельними розчинами хроматографували розчин порівняння, отримуючи в сумі не менше 3 паралельних хроматограм.

Розраховували відношення середніх значень площ піків цефуроксиму із хроматограм кожного з 9 розчинів до середнього значення площ піків цефуроксиму із хроматограм розчину порівняння, отримуючи величини  $Y_i = (S_i$

$/ S_{st}) \times 100$ . Знаходили також величину  $Z = 100 \times (Y_i / X_i)$ , яка являє собою знайдену концентрацію у відсотках до введеної. Результати розрахунків наведені в Табл. П.2.4. Критерії — див. П.2.1.3.

Розрахунки параметрів лінійної залежності  $Y = b \times X + a$  проводили методом найменших квадратів. Результати розрахунків — величини  $b$ ,  $s_b$ ,  $a$ ,  $s_a$ ,  $s_r$  (залишкове стандартне відхилення) і  $R_c$  (коефіцієнт кореляції) — наведені в Табл. П.2.3, отримана в нормалізованих координатах пряма — на Рис. П.2.6.

## П.2.4. Результати і їх обговорення

### П.2.4.1. Придатність хроматографічної системи

Оптимальним є вибраний вміст ацетонітрилу в рухомій фазі 8 %, оскільки за такої умови час хроматографування суттєво зменшується, пік цефуроксиму розділяється з найближчими піками домішок, піки домішок відділяються між собою (див. Рис. П.2.1).

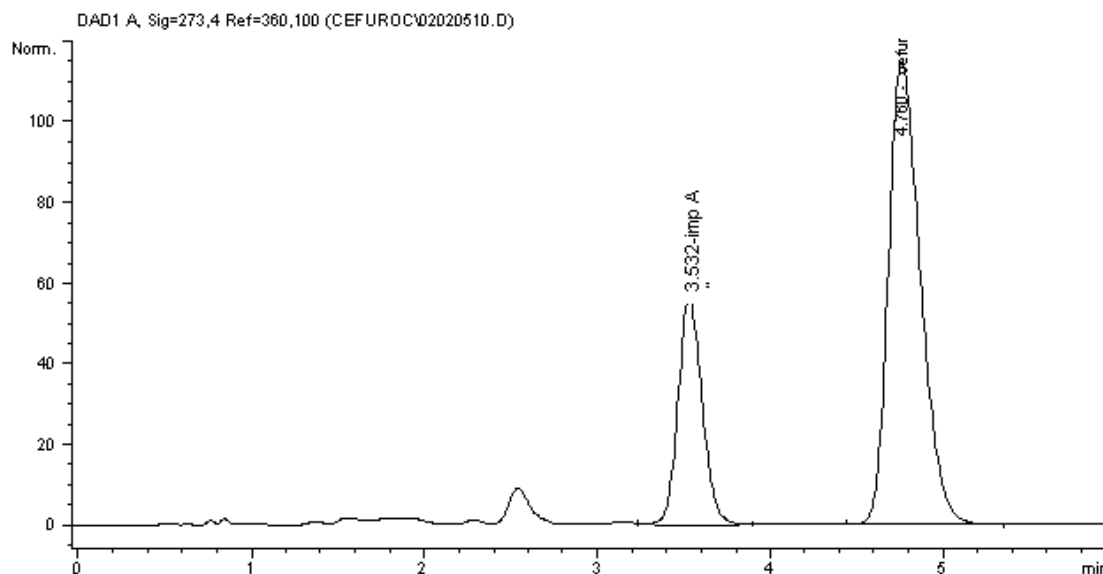


Рисунок П.2.1. Типова хроматограма розчину порівняння (b) у разі вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі 8 %

### П.2.4.2. Специфічність

Як видно з Рис. П.2.2-П.2.3, профілі домішок на хроматограмах «репрезентативного» розчину, одержаних на різних колонках, співпадають, піки домішок розділяються від піка цефуроксиму і піка домішки А (конкретно наведеної у специфікації), для піка цефуроксиму на хроматограмах «репрезентативного» розчину виконуються вимоги випробування на чистоту піка. Отже, методика специфічна.



2.3	3.22	0.01	
2.8	8.06	0.04	
3.3 (домішка А)	14.59	0.06	
5.7	10.34	0.04	
8.9	9.42	0.04	
10.2	2.95	0.01	
12.3	30.74	0.13	
14.4	3.66	0.02	
Сума домішок	89.75	0.39	
<i>Випробовуваний розчин через 6 год зберігання</i>			
Час утримування домішки, хв	Середня площа піка домішки	Вміст домішки, % до середньої площі піка цефуроксиму із хроматограм розчину порівняння	$ Dif(stab)  \leq 0.07\%$ $ \Sigma Dif(stab)  \leq 0.21\%$
1.1	1.40	0.01	0.00
1.3	1.71	0.01	0.00
1.7	0.54	0.00	0.00
1.9	4.02	0.02	0.00
2.3	10.91	0.05	0.04
2.8	8.79	0.04	0.00
3.3 (домішка А)	42.82	0.19	$0.13 \geq 0.07$
5.7	9.47	0.04	0.00
8.9	9.73	0.04	0.00
10.2	2.56	0.01	0.00
12.3	31.59	0.14	0.01
14.4	3.80	0.02	0.00
Сума домішок	126.30	0.55	$0.16 \leq 0.21$

Як видно, вміст індивідуальних домішок і їх суми у випробовуваному розчині через 6 год змінюється в допустимих межах, тобто задовольняє співвідношення (5.7). Виключенням є домішка А цефуроксиму (час утримування 3.3 хв), для якої співвідношення (5.7) не виконується. Однак за такої умови її вміст залишається менше критичного значення співвідношення (5.2) для межі кількісного визначення ( $QL \leq 0.32\%$ ). Сума домішок через 6 год також залишається в допустимих межах специфікації ( $\leq 3.0\%$ ), тому збільшення вмісту домішки А у випробовуваному розчині за досліджуваній проміжок часу не могло б вплинути на позитивний висновок про якість препарату під час рутинного контролю. Але якщо вміст домішки А в препараті перевищував би  $0.32\%$ , то не виключено, що через 6 год зберігання розчину, препарат би не відповідав вимогам специфікації.



На підставі викладеного вище в методику специфікації було внесено вказівку готувати випробовуваний розчин для випробування на супровідні домішки безпосередньо перед хроматографуванням, щоб виключити можливість накопичення домішки А в розчині.

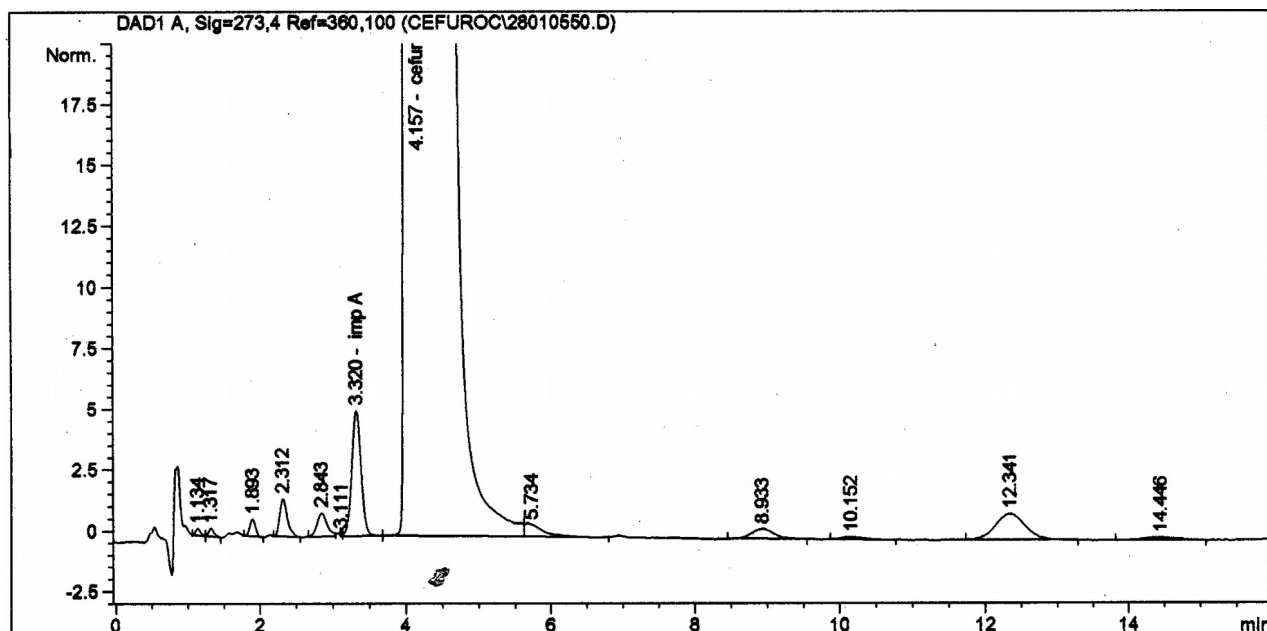


Рисунок П.2.4. Типова хроматограма випробовуваного розчину, одержана під час перевірки стабільності випробовуваного розчину в умовах методики специфікації

Результати дослідження стабільності свідчать про значну небезпеку отримання негативних щодо вмісту домішки А результатів за рахунок розкладу препарату в процесі аналізу.

Для того щоб з'ясувати, чи може це призвести до неправильного висновку про якість препарату, нами були змодельовані умови, за яких іде інтенсивне накопичення домішки А цефуроксиму: кімнатна температура автосамплера, температура колонки 35 °С, вміст ацетонітрилу в рухомій фазі 3 %.

У Табл. П.2.2 наданий розрахунок вмісту домішок у випробовуваному розчині — свіжоприготованому і через 2.5 год після приготування. Типова хроматограма наведена на Рис. П.2.5.

Таблиця П.2.2

Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину в умовах інтенсивного накопичення домішки А (середня площа піка цефуроксиму із хроматограм розчину порівняння (с) = 218.5)

<i>Випробовуваний розчин свіжоприготований</i>		
Час утримування домішки, хв	Середня площа піка домішки	Вміст домішки, % до середньої площі піка цефуроксиму із хроматограм

		розчину порівняння	
1.5	2.00	0.01	
2.6	6.67	0.03	
3.8	4.91	0.02	
4.2	9.67	0.04	
4.9	49.55	0.23	
7.6 (домішка А)	145.84	0.67	
9.3	18.82	0.09	
31.5	23.21	0.11	
38.0	27.04	0.12	
Сума домішок	274.24	1.26	
<i>Випробовуваний розчин через 2.5 год зберігання</i>			
Час утримування домішки, хв	Середня площа піка домішки	Вміст домішки, % до середньої площі піка цефуроксиму із хроматограм розчину порівняння	$ Dif(stab)  \leq 0.07 \%$ $ \Sigma Dif(stab)  \leq 0.21 \%$
1.5	3.87	0.02	0.01
2.6	11.02	0.05	0.02
3.8	4.93	0.02	0.00
4.2	8.54	0.04	0.00
4.9	91.67	0.42	$0.19 \geq 0.07$
7.6 (домішка А)	247.59	1.13	$0.46 \geq 0.07$
9.3	18.28	0.08	0.01
31.5	22.20	0.10	0.01
38.0	26.98	0.12	0.00
Сума домішок	421.45	1.93	$0.67 \geq 0.21$

Як видно із Табл. П.2.2, зміни вмісту індивідуальних домішок у випробовуваному розчині через 2.5 год знаходяться в допустимих межах співвідношення (5.7) для більшості домішок, крім домішки А цефуроксиму (час утримування 7.6 хв) і домішки з часом утримування 4.9 хв. Водночас зміна суми домішок за 2.5 год також виходить за вимоги співвідношення (5.7), тобто випробовуваний розчин є нестійким протягом 2.5 год у вибраних хроматографічних умовах.

Вміст домішки А вже у свіжоприготованому розчині перевищує критичне значення (0.32 %) співвідношення (5.2) для  $QL$ . Після закінчення 2.5 год після приготування вміст домішки А перевищує гранично допустимий вміст за специфікацією (не більше 1.0 %), тобто під час рутинного аналізу під час контролю якості препарату стояло би питання про невідповідність вимогам специфікації.

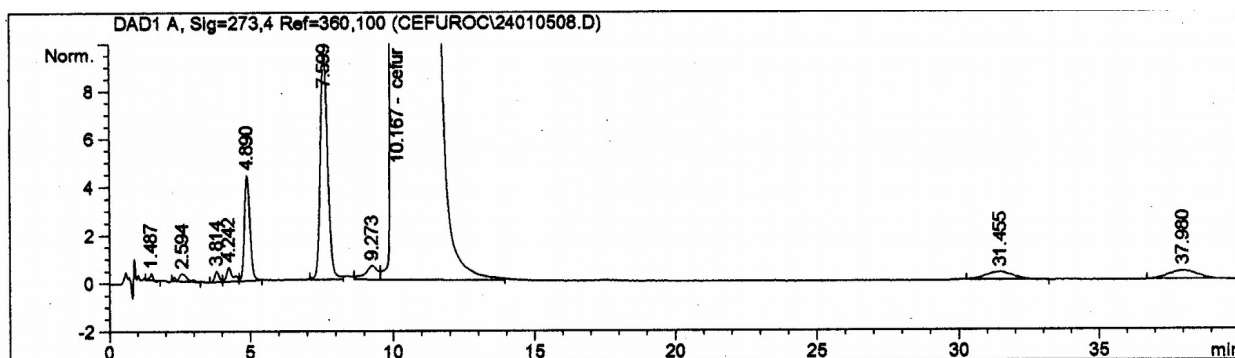


Рисунок П.2.5. Типова хроматограма випробовуваного розчину, отримана під час перевірки стабільності випробовуваного розчину за кімнатної температури автосамплера і температури термостата колонки 35 °С

Результати досліджень стабільності (Табл. П.2.1-П.2.2) наочно показують безглуздість знаходження в цьому випадку істинних значень  $DL$  і  $QL$  — ці величини є недосяжними з причини розкладу цефуроксиму і накопичення домішки в умовах аналізу. Водночас запропонований підхід, який ґрунтується на підтвердженні відповідності  $DL$  і  $QL$  гранично допустимим значенням (співвідношення (5.1-5.2)), дозволяє коректно оцінити якість продукції.

#### П.2.4.4. Лінійність

Оцінювання лінійності проводиться відповідно до схеми, описаної раніше в розділі 4.4.3. Результати наведені в Табл. П.2.3, регресійна пряма — на Рис. П.2.6. Критерії — див. розділ П.3.1.3.

Як видно із Табл. П.2.3, у нашому випадку виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій 25-125 %.

Таблиця П.2.3

Метрологічні характеристики лінійної залежності  $Y = b \times X + a$

Назва величини	Значення	Критерії (максимально допустима невизначеність результатів аналізу 5 %; число точок 9 у діапазоні 25-125 %)	Висновок (відповідає чи ні)
$b$	0.981	—	—
$s_b$	0.0069	—	—
$a$	1.28	(1) $\leq 1.89 \times s_a = 1.07$ ; (2) якщо не виконується (1), то $\leq 2.1$ ;	відповідає за критерієм (2)

Назва величини	Значення	Критерії (максимально допустима невизначеність результатів аналізу 5 %; число точок 9 у діапазоні 25-125 %)	Висновок (відповідає чи ні)
$S_a$	0.57	—	—
$S_r$	0.78	$\leq 2.6$	відповідає
$r$	0.9998	$\geq 0.9976$	відповідає

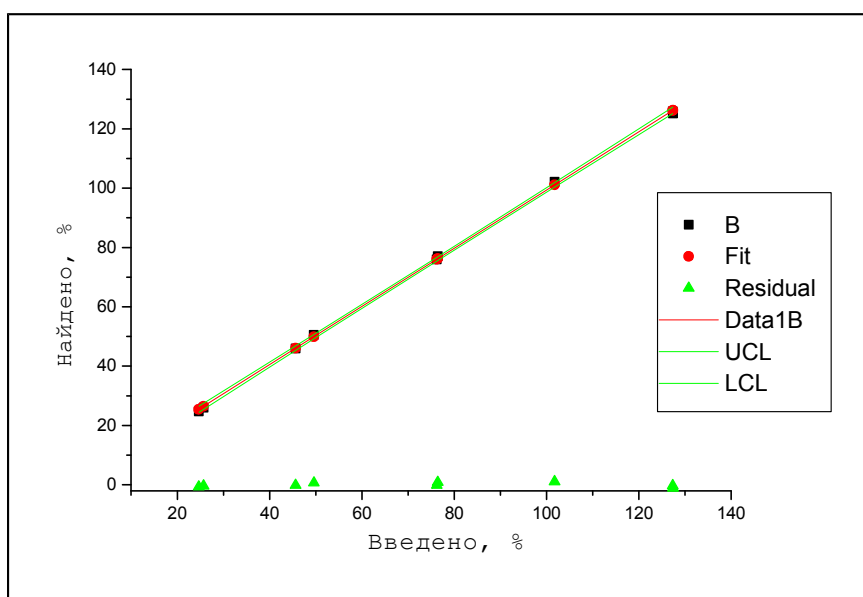


Рисунок П.2.6. Лінійна залежність площ піків цефуроксиму гідрохлориду (знайдено у % до відклику цефуроксиму в розчині порівняння) від концентрацій модельних розчинів (введено у % до концентрації розчину порівняння) у нормалізованих координатах

#### П.2.4.5. Збіжність і правильність

Оцінювання збіжності і правильності проводиться відповідно до схеми, описаної у розділі 4.4.1-4.4.2 і співвідношенням (5.6), а також критеріїв розділу П.3.1.3. Результати наведені в Табл. П.2.4.

З Табл. П.2.4 видно, що методика аналізу характеризується прийнятною збіжністю і правильністю в усьому діапазоні концентрацій 25-125 %.

Таблиця П.2.4

Результати аналізу модельних сумішей цефуроксиму натрієвої солі і їх статистична обробка (використані критерії розділу 4)

№ модел ьного розчи ну	Теоретич ні концентр ації розчинів, $X_{i теор.}, \%$	Концентр ація розчинів, мг/г ( $C_i^{st} =$ 0.3952)	Введено в % до концентра ції розчину порівнянн я, $X_{i факт.},$ %	Середні площі піків ( $S_i^{st}$ = 212.95)	Знайдено в % до відклику цефуроксим у в розчині порівняння, $Y_i, \%$	Знайдено у % до введеного, $Z_i = 100 \times$ ( $Y_i / X_i$ ), %
1.	25	0.1012	25.66	55.50	26.06	101.81

2.	25	0.0971	24.62	52.70	24.75	100.77
3.	50	0.1804	45.66	97.85	45.95	100.64
4.	50	0.1955	49.59	107.78	50.61	102.32
5.	75	0.3006	76.44	164.23	77.12	101.39
6.	75	0.3005	76.21	161.81	75.98	99.95
7.	100	0.4002	101.77	217.63	102.19	100.92
8.	125	0.5045	127.33	268.23	125.96	98.67
9.	125	0.5048	127.41	266.60	125.19	98.02
Середнє, $\bar{z}$ , %						100.50
Відносне стандартне відхилення, $s_z$ , %						1.41
Відносний довірчий інтервал $\Delta \% = t(95 \%, 8) \times s_z = 1.86 \times s_z =$						2.62
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{imp}, \% \leq$						5.0
Систематична похибка $\delta =   \bar{z} - 100  $						0.50
Критерій незначущості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta / 3 = 2.62 / 3 = 0.87$ ; якщо не виконується 1), то $\delta \leq 5.0 \times 0.32 = 1.6$						виконується  виконується
<b>Загальний висновок про методику:</b>						<b>коректна</b>

#### П.2.4.6. Межа кількісного визначення і межа виявлення

Розрахунок межі кількісного визначення і межі виявлення наведений у Табл. П.2.5. Оцінювання проводили відповідно до співвідношень (4.19-4.20) і критеріїв (5.1-5.2) і П.2.1.3.

Таблиця П.2.5

$s_a$	$QL, \%$	Критичне значення для $QL, \%$	$DL, \%$	Критичне значення $PO, \%$
0.5652	5.7	32	1.9	10

Як видно, розраховані значення  $DL$  і  $QL$  значно нижче критичних значень  $DL$  і  $QL$ , що є доказом коректності контролю домішок за допомогою цієї методики.