

## 5. КОНТРОЛЬ ВМІСТУ ДОМІШОК У ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Методики визначення супровідних домішок під час дослідження стабільності лікарських засобів (ЛЗ) у процесі зберігання є кількісними випробуваннями і мають бути валідовані.

Контроль вмісту домішок у ЛЗ поєднує в собі ознаки граничного і кількісного випробувань. У разі контролю готового продукту на підприємствах і в контрольних лабораторіях на відповідність специфікації ми маємо справу з граничним випробуванням, оскільки досліджується питання лише про те, чи перевищує вміст домішок допуски специфікації чи ні. Водночас методика контролю вмісту домішок, яка описана в специфікації, застосовується для дослідження стабільності і контролю виробництва ЛЗ. У цьому разі важливою є не тільки відповідність вмісту домішок вимогам специфікації, але й сам вміст домішок. Тобто ми маємо справу з кількісним випробуванням. Валідаційні критерії для обох випадків різняться.

Питання валідації методик кількісного визначення ЛЗ у варіанті методу стандарту докладно розглянуті в попередніх розділах. Водночас валідація методик контролю домішок у ЛЗ має свою специфіку.

Найважливішим методом контролю домішок у субстанціях і готових ЛЗ (ГЛЗ) є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), яка домінує в цьому випробуванні над іншими методами.

Далі розглядається найбільш поширений випадок — валідація ВЕРХ-методики контролю домішок у ГЛЗ, виготовленому на основі субстанції, яка відповідає вимогам фармакопейної монографії. Передбачається також, що методика, яка валідується, уведена до специфікації, в якій регламентований граничний вміст домішок. Як таку методику доцільно використовувати методику, описану в монографії Фармакопеї на субстанцію, або безпосередньо методику, описану в монографії Фармакопеї на ГЛЗ. Однак оскільки допоміжні речовини конкретних ГЛЗ у Фармакопеї не описані, то навіть описана у Фармакопеї методика все одно потребує валідації. У принципі, ці методики можуть застосовуватися й для значно менших або більших концентрацій домішок, однак у цьому разі вимоги до їх валідації, загалом, можуть бути зовсім іншими.

Рекомендації з проведення валідації наводяться нижче для ВЕРХ, однак усі отримані висновки і підходи без будь-яких суттєвих змін застосовні і до газової хроматографії.

Якщо немає особливих вказівок, то використовуються одnobічні довірчі інтервали для ймовірності 95 %.

Особливістю контролю домішок є те, що тут нема номінального значення, тому для отримання нормалізованих координат  $X_i$  в рівняннях (4.1) доцільно замість  $C_{st}$  використовувати максимально допустимий за специфікацією вміст

домішок  $ImL$ , тобто концентрації домішок виражати у відсотках до  $ImL$ . Це дозволяє зберегти основні принципи стандартизованої процедури валідації, яка розвинута в попередніх розділах.

### 5.1. Межа виявлення ( $DL$ )

На відміну від методик кількісного визначення (де  $DL$  має інформаційний характер), в граничних випробуваннях (під час проведення контролю вмісту домішок на відповідність специфікації), ця величина є важливою, оскільки аналіз не може проводитися для концентрацій, менших  $DL$ .

Використання різних умов аналізу дозволяє отримати різні значення  $DL$ . Які ж значення  $DL$  є (та чи є) достатніми для коректного контролю домішок за специфікацією?

На підставі принципу незначущості (4.7) у формулюванні (4.9)  $DL$  є достатньою для аналізу за специфікацією і значуще не впливає на прийняття/ухвалення рішень про якість для граничних випробувань, якщо вона є незначущою порівнюючи з максимально допустимим за специфікацією вмістом домішки  $ImL$ , тобто:

$$\begin{aligned}
 DL &\leq \max DL = 0.32 \cdot ImL, \\
 DL(\%) &= 100 \cdot \frac{DL}{ImL} \leq \\
 &\leq \max DL(\%) = 32\%.
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

#### граничні випробування:

Тут  $DL$  (%) — межа виявлення в нормалізованих координатах. Вона знаходиться за співвідношенням (4.19) виходячи на підставі стандартного відхилення ( $s_a$ ) вільного члена ( $a$ ) лінійної залежності.

Для знаходження  $DL$  необхідно проводити дослідження в зоні концентрацій, яка близька до цієї  $DL$ , але часто не становить жодного інтересу для контролю домішок за специфікацією. Тому під час проведення валідації методики контролю домішок немає необхідності знаходити справжнє значення  $DL$  — достатньо лише довести, що  $DL$  задовольняє співвідношення (5.1). Це суттєво спрощує завдання, оскільки справжнє значення  $DL$  може бути в десятки і навіть сотні разів менше  $\max DL$  зі співвідношення (5.1).

Слід зазначити ще один важливий аспект. Як правило, ми не можемо отримати абсолютно чисту основну речовину (без продуктів деградації). Під час проведення контролю домішок часто доводиться рахуватися з неминучим розкладом основної речовини під час пробопідготовки, зберігання випробовуваного і стандартного розчинів і хроматографування, що призводить, відповідно, до збільшення вмісту домішок, що виявляються. Водночас, залежно від умов, вміст домішок може збільшуватися в багато разів порівнюючи з вихідним. Це призводить до того, що для кожного зразка

існує деяка гранична мінімальна концентрація, нижче якої ми вже виявляємо не реальний вміст домішок у вихідному випробовуваному зразку, а той, який утворився в процесі пробопідготовки, зберігання і хроматографування. Тому робота в зоні дуже малих концентрацій домішок пов'язана з небезпекою великих систематичних похибок. Типова ілюстрація цього наведена в *Прикладі 2*.

Цих недоліків позбавлений підхід, який ґрунтується на співвідношенні (5.1).

## 5.2. Межа кількісного визначення ( $QL$ )

Аналогічно граничним випробуванням межа кількісного визначення ( $QL$ ) є достатньою для аналізу за специфікацією і значуще не впливає на ухвалення рішень про якість для кількісних випробувань, якщо вона є незначущою порівнюючи з максимально допустимим за специфікацією вмістом домішки  $ImL$ , тобто, ураховуючи співвідношення (4.9):

$$\begin{aligned}
 & QL \leq \max QL = 0.32 \cdot ImL, \\
 \text{кількісні} & \quad QL(\%) = 100 \cdot \frac{QL}{ImL} \leq \\
 \text{випробування:} & \quad \leq \max QL(\%) = 32\%.
 \end{aligned} \tag{5.2}$$

$QL$  (%) — межа кількісного визначення в нормалізованих координатах (тобто у відсотках до  $ImL$ ). Вона знаходиться зі стандартного відхилення ( $s_a$ ) вільного члена ( $a$ ) лінійної залежності за співвідношенням (4.20).

Ураховуючи співвідношення (4.19-4.20) і взаємозв'язок між  $DL$  і  $QL$ , вимоги (5.2) до  $QL$  відповідають таким вимогам до  $DL$ :

$$\begin{aligned}
 & DL \leq \max DL = 0.10 \cdot ImL, \\
 \text{кількісні} & \quad DL(\%) \leq \max DL(\%) = 10\%.
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

**випробування:**

Співвідношення (5.2) і (5.3) еквівалентні. На практиці простіше оперувати однією величиною  $DL$ , ніж двома ( $DL$  і  $QL$ ), тому під час проведення кількісних випробувань рівняння (5.3) зручніше, ніж (5.2).

## 5.3. Діапазон

Під час контролю домішок за специфікацією нас не цікавлять значення їх концентрацій нижче  $\max DL$ , тому діапазон досліджуваних концентрацій необхідно вибирати так, щоб нижча його межа була дещо нижче  $\max DL$  (тобто знаходилася в зоні  $\max DL$ , яку ми і шукаємо).

Ураховуючи співвідношення (5.1), для граничних і кількісних випробувань на домішки доцільно використовувати такий діапазон:

$$\begin{aligned}
 \text{граничні і кількісні} & \quad \text{діапазон: } 25\text{--}125 \% \text{ від } ImL. \\
 \text{випробування:} & \tag{5.4}
 \end{aligned}$$

#### 5.4. Вимоги до невизначеності аналітичної методики

Для кількісних випробувань вимоги до невизначеності методики аналізу визначаються допусками вмісту за специфікацією компонента, що аналізується ( $\pm B$  % від номінального вмісту) — див. співвідношення (4.8-4.9). Однак у разі контролю домішок у ЛЗ їх номінальний вміст і допуски відсутні — у специфікації /зазначається лише верхня межа (не більше ...%). Тому для встановлення вимог до максимально допустимої невизначеності методики контролю домішок  $\Delta_{imp}$  доцільно використовувати вимоги до величин  $DL$  і  $QL$  — співвідношення (4.19-4.20, 5.1-5.3).

Ураховуючи, що коефіцієнт Гауса для ймовірності 95 % (прийнятої для розрахунку  $\Delta_{imp}$ ) дорівнює 1.65, отримаємо для генеральних величин  $\Delta_{imp} = 1.65 \times s_a = 0.5 \times DL$ . Тоді зі співвідношень (5.1-5.3) отримаємо вимоги до максимально допустимої невизначеності методики контролю домішок  $\Delta_{imp}$ :

**граничні випробування:** 
$$\Delta_{imp} \leq 16\% , \quad (5.5)$$

**кількісні випробування:** 
$$\Delta_{imp} \leq 5\% . \quad (5.6)$$

Вимоги (5.5-5.6) до невизначеності методики контролю домішок ( $\Delta_{imp}$ ) ґрунтуються на співвідношеннях (5.1-5.3) і є достатніми.

Перевагою такого підходу є його чіткий зв'язок з  $DL$ ,  $QL$  і  $ImL$ , що дозволяє пов'язати його і з параметрами лінійної залежності (4.2). Крім того, співвідношення (5.5-5.6) встановлюють невизначеність у відсотках до  $ImL$  домішки незалежно від концентрації цієї домішки. Тому, наприклад, для концентрації домішки  $0.5 \times ImL$  відносна невизначеність кількісного випробування буде, відповідно до (5.6), не 5 %, а 10 %. Тобто менші концентрації мають більшу відносну невизначеність, що є природним і вигідно відрізняє цей підхід от інших.

#### 5.5. Специфічність

Під час контролю домішок у ГЛЗ зазвичай регламентується вміст якихось конкретних домішок, вміст будь-яких інших і сума всіх домішок.

Як вже йшлося вище, передбачається, що методика контролю домішок у ГЛЗ є фармакопейною — тобто або та сама, що й для субстанції, або описана в монографії Фармакопеї на ГЛЗ. Це означає, що ця методика валідована для субстанції і, за умови виконання тесту на придатність хроматографічної системи, забезпечує необхідний контроль домішок субстанції. Отже, під час перевірки специфічності цієї методики для ГЛЗ необхідно довести відсутність ефектів матриці (допоміжних речовин), тобто довести, що:

- піки всіх можливих домішок розчину ГЛЗ в умовах специфікації відділяються від основного піка (тобто вміст домішок не занижується);

- піки допоміжних речовин або продуктів їх взаємодії із субстанцією значуще не впливають на піки конкретно домішок, що регламентуються.

Одним зі шляхів такого доказу є порівняння профілів домішок «стресових» розчинів і вихідних розчинів плацебо ГЛЗ, субстанції і ГЛЗ.

«Стресові» розчини можна отримати шляхом деградації ГЛЗ, субстанції, плацебо ГЛЗ у процесі лужного а/або кислотного гідролізу, нагріву, окислення, ультрафіолетового опромінення.

Специфічність методики можна вважати доведеною якщо:

- На всіх хроматограмах «стресових» розчинів плацебо відсутній пік домішки із часом утримання, який співпадає з піками конкретно домішок, що регламентуються, або основної речовини на хроматограмах розчинів субстанції. Якщо такі домішки присутні, їх вміст не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результату визначення індивідуальної домішки  $\Delta_{Imp}$  — див. рівняння (5.5-5.6). Це означає, що допоміжні речовини цього ГЛЗ значуще не впливають на результати контролю домішок за специфікацією.
- На хроматограмах ГЛЗ у стресових умовах піки всіх домішок відділяються від піка основної речовини, а пік основної речовини витримує випробування на хроматографічну чистоту.

## 5.6. Робасність, придатність хроматографічної системи

Специфічність має бути підтверджена на різних колонках (варіюється серія колонки, розмір колонки, фірма-виробник цієї марки сорбенту). Для цього вибирають «стресовий» розчин ГЛЗ, який представляє «найгірший» випадок. Аналогічно вибирають «найгірший» випадок для «стресового» розчину плацебо. На всіх досліджуваних колонках мають витримуватися вимоги до специфічності розділу 5.5.

### 5.6.1. Стабільність досліджуваних розчинів

Перевірка стабільності випробовуваного розчину і розчину порівняння є одним з елементів дослідження робасності методики і має проводитися перед початком усіх інших валідаційних досліджень. Для методик кількісного визначення це питання розглянуто в попередніх розділах. Під час перевірки стабільності розчинів для методики визначення супровідних домішок використовують підтверджуючий підхід: розчин вважають стабільним, якщо знайдений у ньому вміст будь-якої з індивідуальних домішок або суми домішок через вибраний проміжок часу відрізняється від вмісту цієї домішки або суми домішок у свіжоприготованому розчині не більше ніж на  $\sqrt{2} \times \Delta_{Imp}$ , тобто:

$$|Dif(stab)| \leq \sqrt{2} \times \Delta_{imp} . \quad (5.7)$$

## 5.7. Лінійність

Ці характеристики досліджуються в межах діапазону (див. п. 5.3).

Відповідно до розвинутого у попередніх розділах підходу, дослідження лінійності й інших метрологічних характеристик доцільно проводити в нормалізованих координатах (тобто лінійна залежність  $Y_i = b \times X_i + a$ ). У нашому випадку це означає, що концентрації  $X_i$  (вісь абсцис) беруться у відсотках до граничної концентрації за специфікацією ( $ImL$ ), а площі піків ( $Y_i$ ) беруться у відсотках до площі піка, який відповідає 100 %  $ImL$ . Як слідує зі співвідношення (5.4), валідаційні дослідження достатньо проводити в діапазоні 25-125 % від  $ImL$  — як для граничних, так і для кількісних випробувань.

Для граничних випробувань перевірка лінійності не потрібна. Однак необхідно показати, що чутливість і прецизійність методики достатня для розв'язання поставленого завдання (граничного випробування). Це означає, що треба знайти  $DL$  або  $QL$  і перевірити за рівняннями (5.1-5.3) їх незначущість порівнюючи з  $ImL$ .

Для дослідження лінійності достатньо 5 концентрацій (25, 50, 75, 100 і 125 %). У разі граничних випробувань цього достатньо для розрахунків  $DL$  або  $QL$  і підтвердження необхідної правильності і прецизійності. Однак зазвичай методики контролю домішок валідують і як кількісні випробування — для дослідження стабільності. У цьому разі доцільно проводити дослідження на 9 концентраціях, оскільки з цих даних потім можна розрахувати і характеристики правильності і прецизійності.

Водночас, ураховуючи значно більш ліберальні порівнюючи з кількісним визначенням (Табл. 4.1) вимоги до прецизійності контролю домішок (див. співвідношення (5.5-5.6)), досліджувати 9 точок, розподілених рівномірно по всьому діапазону (як у разі кількісного визначення — див. розділ 4.2), видається занадто складним. Більш доцільно отримати по 2 точки для кожної із 5 концентрацій в інтервалі 25–125 % (25, 50, 75, 100 і 125 %). При Водночас одна з точок, яка відповідає концентрації 100 %, береться за стандарт для отримання нормалізованих координат (див. розділ 4.1). У підсумку в нас залишається  $g = 9$  точок (25, 25, 50, 50, 75, 75, 100, 125, 125 %), тобто стільки ж, скільки для кількісного визначення (п. 4.1-4.3).

Ураховуючи співвідношення (5.5-5.6) і розвинутий у попередніх розділах підхід, критичне значення залишкового стандартного відхилення лінійної залежності ( $SD_o$ ) знаходиться зі співвідношення:

**граничні випробування:**

$$SD_o(\%) \leq \Delta_{imp}(\%) / t(95\%, g - 2) = 16 / 1.89 = 8.4\%, \quad (5.8)$$

**кількісні випробування:**

$$SD_o(\%) \leq \Delta_{imp}(\%) / t(95\%, g - 2) = 5 / 1.89 = 2.6\%. \quad (5.9)$$

Для наших 9 точок (25, 25, 50, 50, 75, 75, 100, 125, 125 %) величина  $SD_x = SD_{range} = 38.41\%$  (див. (4.3)). Критичні значення коефіцієнта кореляції  $R_c$  для нашого випадку, урахувавши співвідношення (5.8-5.9) і (4.4), дорівнюють:

**граничні випробування:**

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{SD_o^2}{SD_{range}^2}} = 0.9755, \quad (5.10)$$

**кількісні випробування:**

$$R_c \geq 0.9976. \quad (5.11)$$

Вимоги до вільного члена  $a$ :

- 1) статистично незначуща відмінність від нуля, тобто, урахувавши (4.17):

$$a \leq t(95\%, g - 2) \times s_a = 1.89 \times s_a; \quad (5.12)$$

- 2) у разі невиконання співвідношення (5.11) (тобто  $a$  статистично значуще відрізняється від нуля) — практична незначущість; урахувавши (5.5-5.6) і (4.18), отримаємо в нормалізованих координатах, тобто в нашому випадку

**кількісні випробування:**

$$|a| \leq \frac{0.32 \times \Delta_{imp}(\%)}{1 - (25/100)} = 2.1\%, \quad (5.13)$$

**граничні випробування:**

$$|a| \leq \frac{0.32 \times \Delta_{imp}(\%)}{1 - (25/100)} = 6.8\%. \quad (5.14)$$

## 5.8. Правильність і прецизійність

Ці характеристики знаходяться таким самим шляхом, як і для кількісного визначення (див. розділ 4.4).

Типовий приклад проведення валідації методики контролю домішок методом ВЕРХ наведений у *Прикладі 2*.