

10. КОНТРОЛЬ ЗАЛИШКОВИХ РОЗЧИННИКІВ У ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

10.1. Постановка завдання

У попередніх розділах були розглянуті стандартизовані процедури валідації методик кількісного визначення і контролю супровідних домішок. Контроль залишкових розчинників (ЗР) має багато спільного з контролем супровідних домішок, однак, з огляду на обмежений набір цих розчинників, піддається стандартизації. Зокрема, загальна стаття *«Ідентифікація залишкових розчинників і контроль їх кількостей» (2.4.24)* рекомендує ідентифікацію і контроль ЗР проводити методом парофазової газової хроматографії за єдиною стандартизованою фармакопейною методикою. Хроматографування проводять на капілярних колонках (30 м), що дозволяє добитися необхідної ефективності розділення більшості з 59 залишкових розчинників, описаних у загальній статті *«Залишкові кількості органічних розчинників» (5.4)*. Для нівелювання матричних ефектів (розчинена речовина, що аналізується, впливає на концентрацію ЗР у паровій фазі) аналіз проводиться методом стандартних добавок.

Згідно зі статтею 2.4.24, стандартизована фармакопейна методика може застосовуватися в таких випадках:

- 1) для ідентифікації більшості ЗР 1-го і 2-го класів токсичності в субстанціях, допоміжних речовинах і готових лікарських засобах, якщо ці розчинники відомі;
- 2) як випробування на граничний вміст ЗР 1-го і 2-го класів токсичності, якщо вони присутні в субстанціях, допоміжних речовинах і готових лікарських засобах;
- 3) для кількісного визначення ЗР 2-го класу токсичності, якщо межі їх вмісту перевищують 1000 ppm (0.1 %), або, якщо це необхідно, для кількісного визначення ЗР 3-го класу токсичності.

Як видно, ця методика може застосовуватися і як граничне (п. 2), і як кількісне (п. 3) випробування. У разі граничного випробування валідації фармакопейної методики не потребується. У разі ж кількісного випробування в конкретній речовині необхідна валідація (див. Табл. 1.1). Валідація методики необхідна також у разі її суттєвої модифікації.

На практиці застосування методики 2.4.24 викликає низку питань:

1. Застосування методики 2.4.24 потребує достатньо тривалого часу. Так, тривалість однієї хроматограми ЗР 2-го класу для системи А досягає 40 хв, а таких хроматограм потрібно не менше шести.
2. Методика 2.4.24 має занадто загальний характер, що ускладнює її застосування в специфікаціях підприємств. Дійсно, якщо,

наприклад, у субстанції необхідно контролювати тільки 2-3 ЗР, то яка необхідність використовувати загальну методику для контролю 59 розчинників? Слід звернути увагу на те, що під час рутинного контролю використовується підтверджуючий підхід (див. розділ 4.4.1) — ми контролюємо тільки ті домішки, які можуть бути за специфікацією.

Ураховуючи все це, а також дорожнечу обладнання для парофазового аналізу, на практиці досить часто бувають випадки, коли умови методики 2.4.24 доводиться модифікувати або повністю змінювати. Часто доцільно розробити просту непарофазову газохроматографічну методику зокрема і на набивних колонках. Такий аналіз можна проводити як методом стандартних добавок, так і звичайними методами абсолютного калібрування (зовнішнього стандарту) або внутрішнього стандарту. У всіх цих випадках розроблені методики мають бути валідовані. Водночас виникають питання формулювання критеріїв прийнятності отриманих результатів, а також стандартизації процедури проведення валідації.

У цьому розділі контроль ЗР розглядається тільки як граничне випробування, оскільки кількісний аналіз ЗР не належить до контролю якості й у фармакопейному аналізі зустрічається дуже рідко.

10.2. Відмінність між граничними і кількісними випробуваннями

Відповідно до Табл. 1.1, для граничних випробувань необхідно перевіряти тільки специфічність і межу виявлення (DL). Коректність цього положення, однак, викликає великі сумніви. Дійсно, адже граничне випробування застосовується для контролю якості субстанцій, допоміжних речовин і готових лікарських засобів. За результатами цього випробування робиться висновок про їх якість (бракувати чи не бракувати). Водночас цей висновок має відтворюватися як у межах цієї лабораторії, так і в різних лабораторіях. Безумовно, виробник має забезпечувати наявність таких кількостей ЗР, щоб гарантувати позитивний результат у різних лабораторіях (тобто застосовувати так звані «гарантуючі допуски»). Однак для цього необхідно знати граничну повну невизначеність методики аналізу (включаючи випадкову і систематичну складові). Крім того, цю невизначеність необхідно знати для різних концентрацій ЗР. Граничну невизначеність методики аналізу характеризує значною мірою DL , однак лише в тому разі, коли DL розраховується з параметрів лінійної залежності (див. розділ 2.7.3).

Загалом граничні випробування концептуально мало чим відрізняються від кількісних визначень з односторонніми допусками. Відповідно, валідація цих випробувань мало відрізняється від валідації кількісних визначень. Різниця фактично зводиться до більшої допустимої невизначеності.

10.3. Максимально допустима невизначеність методики аналізу

Вихідним пунктом розробки усіх валідаційних критеріїв є з'ясування, яка максимальна невизначеність методики аналізу є прийнятною. Фармакопейна методика контролю ЗР (2.4.24) має критерії придатності системи, що, здавалося б, дозволяє з'ясувати, яка максимальна невизначеність методики аналізу є прийнятною. Однак поняття «максимальна невизначеність методики аналізу» є достатньо невизначеним у разі фармакопейної методики контролю ЗР.

Контроль ЗР за фармакопейною методикою проводиться методом стандартних добавок. До випробовуваного розчину речовини, що аналізується, додаються кількості ЗР, які відповідають їх гранично допустимим за Фармакопеею концентраціям (ImL). Цей розчин використовується як розчин порівняння. Проводиться хроматографування газової фази над випробовуваним розчином і розчином порівняння (по 3 хроматограми).

Розраховують середні значення площ піків аналізованих ЗР із хроматограм випробовуваного розчину ($S_{test,j}$) і розчину порівняння ($S_{ref,j}$). Має виконуватися така нерівність для кожного (j) ЗР:

$$K_{Im,j} = \frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} \leq 0.5. \quad (10.1)$$

Розраховують 3 попарних різниці площ піків $dif_j = S_{ref,j} - S_{test,j}$. Відносне стандартне відхилення ($RSD_{dif,j}$) цих 3 різниць для кожного (j) ЗР не має перевищувати 15 % (придатність системи):

$$RSD_{dif,j}(3) \leq 15\%. \quad (10.2)$$

Ураховуючи, що $t(0.95, 2) = 2.92$, відносний довірчий інтервал середнього значення різниць площ піків (Δ_{dif}), який відповідає нерівності (10.2), дорівнює:

$$\Delta_{dif} \leq \frac{2.92 \cdot 15}{\sqrt{3}} = 25.3\%. \quad (10.3)$$

Критерієм прийнятності вмісту ЗР в аналізованому зразку є співвідношення (4.1), яке регламентує гранично допустиме значення відношення (K_{Im}) площ піків випробовуваного і стандартного розчинів. Водночас точність методики регламентується співвідношенням (10.2), яке встановлює вимоги до гранично допустимої точності різниці площ піків стандартного і випробовуваного розчинів. Між співвідношеннями (10.1) і (10.2) немає простого взаємозв'язку, тому величину Δ_{dif} не можна вважати невизначеністю методики аналізу. Здавалося б, невизначеністю методики

можна вважати невизначеність відношення K_{Im} (розрахунок його дивіться нижче). Однак невизначеність величини K_{Im} мало характеризує невизначеність вмісту ЗР в аналізованому зразку, оскільки значно слабкіше залежить від концентрації ЗР, ніж сама площа піка ЗР (у зоні ImL , в інших діапазонах ще слабкіше).

Становить інтерес з'ясування питання, яким саме невизначеностям площ піків стандартного і випробовуваного розчинів відповідає співвідношення (10.2) і яка у такому разі невизначеність величини K_{Im} .

Оскільки розчин порівняння являє собою випробовуваний розчин із добавкою ЗР у концентраціях, які відповідають гранично допустимим за Фармакопеею (ImL), то для генеральних величин площ j -го ЗР можна записати:

$$S_{ref,j} = S_{test,j} + S_{ImL,j} . \quad (10.4)$$

Тут індекс «*ref*» стосується розчину порівняння, «*test*» — випробовуваного розчину, а «*ImL*» — теоретичної площі піка, який відповідає ImL .

Звідси отримаємо:

$$S_{ImL,j} = dif_j = S_{ref,j} - S_{test,j} . \quad (10.5)$$

Стандартне відхилення величини dif_j ($RSD_{dif,j}$) регламентується співвідношенням (10.2). З іншого боку, ураховуючи (10.5), отримаємо:

$$RSD_{dif,j}^2 = \frac{1}{S_{ImL,j}^2} \cdot (S_{ref,j}^2 \cdot RSD_{ref,j}^2 + S_{test,j}^2 \cdot RSD_{test,j}^2) . \quad (10.6)$$

Найбільший інтерес становить гранична ділянка, коли концентрація ОР близька до ImL . У цьому разі площі S_{ref} і S_{test} не дуже сильно різняться (удвічі), тому можна вважати:

$$RSD_{test,j} = RSD_{ref,j} . \quad (10.7)$$

Тоді, ураховуючи (10.4), рівняння (10.7) набуває вигляду:

$$RSD_{dif,j}^2 = \frac{RSD_{ref,j}^2}{S_{ImL,j}^2} \cdot [(S_{ImL,j} + S_{test,j})^2 + S_{test,j}^2] . \quad (10.8)$$

Оскільки S_{ImL} не залежить від S_{test} , то з рівняння (10.8) видно, що RSD_{dif} росте з ростом S_{test} , тобто з ростом кількості ЗР у субстанції. Тому регламентація $RSD_{dif} \leq 15\%$ (10.2) є невизначеною без регламентації S_{test} або, що те саме, регламентації концентрації ЗР у випробовуваному зразку. Доцільно провести регламентацію для концентрації ЗР на рівні її гранично допустимого вмісту ImL (саме такий випадок становить найбільший практичний інтерес).

Тоді $S_{test} = S_{ImL}$, і рівняння (10.8) набуває простого вигляду (індекс «j» опускаємо, оскільки граничні величини RSD_{ref} є однаковими для всіх ЗР):

$$RSD_{dif} = \sqrt{5} \cdot RSD_{ref}. \quad (10.9)$$

Ураховуючи вимоги ДФУ (10.2) до RSD_{dif} для числа попарних хроматограм $n = 3$ (тобто числа ступенів свободи $f = 2$), отримуємо такі вимоги до RSD_{ref} :

$$RSD_{st}(f = 2) = \frac{RSD_{dif}}{\sqrt{5}} \leq \frac{15}{\sqrt{5}} = 6.7\%. \quad (10.10)$$

Рівняння (10.10) дозволяє встановити вимоги до відносних довірчих інтервалів збіжності площ паралельних хроматограм. Відповідно до співвідношення (10.7), вони є однаковими для випробовуваного і стандартного розчинів:

$$\Delta_{st} = \Delta_{test} \leq \frac{2.92 \cdot 6.7}{\sqrt{3}} = 11.3\%. \quad (10.11)$$

Під час проведення валідації отримують результати з великим числом ступенів свободи, що дозволяє зменшити коефіцієнт Стюдента. Середнє значення, згідно з методикою 2.4.24, знаходять за результатами 3 попарних уведень. Вимоги до RSD_{st} у такому разі визначаються співвідношенням:

$$RSD_{st}(f) \leq \frac{t(95, f = 2)}{t(95, f)} \cdot RSD_{st}(f = 2). \quad (10.12)$$

Тут $t(95, f = 2) = 2.92$ — коефіцієнт Стюдента для одnobічної ймовірності 95 % і числа ступенів свободи $f = 2$; $t(95, f)$ — коефіцієнт Стюдента для одnobічної ймовірності 95 % і числа ступенів свободи f . Водночас вимоги (10.11) до довірчого інтервалу збіжності площ піків залишаються тими самими.

З рівняння (10.12) отримуємо величини RSD_{st} для найбільш поширених чисел ступенів свободи $f = 2, 3$ і 4, а також генеральну величину ($f = \infty$):

$$\begin{aligned} RSD_{st}(f = 2) &\leq 6.7\%, \\ RSD_{st}(f = 3) &\leq 8.3\%, \\ RSD_{st}(f = 4) &\leq 9.2\%, \\ RSD_{st}(f = \infty) &\leq 11.9\%. \end{aligned} \quad (10.13)$$

Рівняння (10.10-10.13) дозволяють встановити такі вимоги до RSD_{st} розчину порівняння, які забезпечують виконання вимог (10.2) статті 2.4.24 (або специфікації), а також встановити вимоги до параметрів лінійної залежності.

Зі співвідношень (10.1) і (10.11) можна отримати вимоги до відносної невизначеності величини K_{Im} :

$$\Delta_{Im} = \Delta_{K,Im} = \sqrt{\Delta_{test}^2 + \Delta_{st}^2} = \sqrt{2} \cdot \Delta_{ref} \leq \sqrt{2} \cdot 11.3 = 16.0\%. \quad (10.14)$$

Статистично ж незначуща різниця між результатами двох лабораторій буде ще в $\sqrt{2}$ раз більше. Отже, якщо в одній лабораторії отримано значення $K_{Im} \geq 0.5$ (що відповідає нормалізованій концентрації ЗР $X \geq 100\%$ від ImL , тобто невідповідність ДФУ), то в іншій лабораторії (яка працює строго за вимогами 2.4.24) може бути:

$$\begin{aligned} K_{Limit} &\geq 0.5 \cdot 100 / (100 + \sqrt{2} \cdot \Delta_{K,Im}) = 0.41, \\ X_{Limit} &\geq 69\%. \end{aligned} \quad (10.15)$$

Тобто є відповідність ДФУ. Водночас величини $K_{Im} = 0.5$ і $K_{Im} = 0.41$ і відповідні їм нормалізовані концентрації (див. попередній розділ 3) $X = 100\%$ і $X = 69\%$ від ImL є статистично нерозрізненними.

Величини $K_{Limit} = 0.41$ і $X_{Limit} = 69\%$ зі співвідношення (10.15) можна розглядати як нижні межі цих величин під час випуску продукції, які забезпечують отримання позитивних результатів у контрольних лабораторіях. У протилежному випадку можливі розбіжності у висновках про якість випробовуваного зразка за статистично нерозрізненних (за ДФУ) результатів. Як видно, навіть за вмісту ЗР $X = 70\%$ від ImL існує статистично значуща небезпека бракування випробовуваної речовини за вмістом ЗР.

Співвідношення (10.14) характеризує граничну невизначеність ($\Delta_{K,Im}$) загальної фармакопейної методики контролю ЗР, яка проводиться у варіанті методу стандартних добавок. Виникає питання про те, якою є гранично допустима невизначеність методики аналізу (Δ_{Im}) під час використання звичайного методу зовнішнього (або внутрішнього) стандарту. Ураховуючи співвідношення (10.7), неважко бачити, що вона співпадає з $\Delta_{K,Im}$, що і зазначено у виразі (10.14).

Зазначимо, що отримані вимоги до невизначеності методик контролю ЗР ($\Delta_{Im} \leq 16\%$) співпадають із вимогами до невизначеності методик контролю домішок методом ВЕРХ — див. співвідношення (5.5). Це підтверджує достатню загальність цих вимог.

10.4. Межа виявлення

Під час дослідження методологічних характеристик методики аналізу і знаходження межі виявлення (DL) і межі кількісного визначення (QL) основними є дослідження лінійності.

Контроль ЗР належить до граничних випробувань. Відповідно до Табл. 1.1, для таких випробувань під час валідації необхідно знаходити тільки DL .

Згідно з ДФУ, величину DL кількісно можна знаходити двома способами — зі співвідношення «сигнал/шум» і з характеристик лінійної залежності. Контроль ЗР за допомогою парофазової газової хроматографії за методикою 2.4.24 є яскравим прикладом того, що співвідношення «сигнал/шум» мало застосовне для розрахунків DL , оскільки цей підхід ураховує тільки хроматографічні складові невизначеності методики аналізу і зовсім не бере до уваги невизначеності пробопідготовки і дозування зразка. Водночас пробопідготовка робить основний внесок у невизначеність методики аналізу в разі рідинної хроматографії із рідкими пробами. Оскільки пробопідготовки в разі газової (звичайної або парофазової) і рідинної хроматографії однакові, а точність їх близька, то те саме можна сказати і за звичайну газову хроматографію. У разі ж парофазової газової хроматографії додатковими і дуже суттєвими факторами, які впливають на невизначеність методики аналізу, є дозування газового зразка і випаровування легколетких ЗР із водних розчинів. Тому розрахунок DL на підставі параметрів лінійної залежності є значно більш надійним і об'єктивним, оскільки враховує як хроматографічні, так і нехроматографічні фактори.

Розрахунок DL (у відсотках до ImL) проводиться за співвідношенням (4.19):

$$DL = 3.3 \times s_a / b. \quad (10.16)$$

Тут s_a — стандартне відхилення вільного члена калібрувальної прямої, b — кут нахилу калібрувальної прямої.

Оскільки лінійні залежності будуються в нормалізованих координатах, то s_a і власне DL знаходяться у відсотках до гранично допустимого за специфікацією вмісту ЗР (ImL).

Принциповим положенням є те, що ми не шукаємо межю виявлення, а тільки доводимо, що вона не перевищує допустиму для нашої методики межю. Це відповідає загальному підходу до контролю якості і валідації методик аналізу лікарських засобів (див. розділи 5.1-5.2).

У разі граничних випробувань відносна межа визначення ЗР (DL) має бути незначущою порівнюючи з гранично допустимою концентрацією ЗР (ImL), яка в нормалізованих координатах береться за 100 %. Як показано в розділі 5.1, у нормалізованих координатах має виконуватися співвідношення (5.1), тобто:

$$DL \leq \max DL = 32\%. \quad (10.17)$$

Зазначимо, що верхня межа DL приблизно співпадає зі статистично незначущою різницею нормалізованих концентрацій у різних лабораторіях ($100 - 69 = 31$ %) у співвідношенні (10.15), яке отримане на підставі зовсім інших міркувань. Це свідчить про достатню загальність

співвідношень (10.14) і (10.17).

10.5. Методика і діапазон

Відповідно до розділу 2.3, під час перевірки лінійності необхідно використовувати не менше 5 точок.

Як показано в розділі 5.2, для кількісних випробувань оптимальним числом точок є 9 (плюс 1 для стандарту, за допомогою якого переводять дані в нормалізовані координати). Кількісні випробування є достатньо поширеними під час контролю домішок методом ВЕРХ. Це пов'язано з накопиченням їх (продуктів деградації) у процесі зберігання, що створює необхідність контролю цього процесу для визначення терміну зберігання. Тому методики контролю домішок методом ВЕРХ зазвичай валідують як кількісні випробування (див. розділ 5).

У випадку ЗР ніякого їх накопичення в процесі зберігання бути не може — вміст ЗР під час зберігання може тільки зменшуватися за рахунок випаровування. Відповідно, немає необхідності вивчати кількісно динаміку зміни вмісту ЗР для встановлення терміну придатності. Тому методики контролю ЗР зазвичай є тільки граничними випробуваннями, вимоги до невизначеності методик аналізу яких є значно ліберальнішими. Беручи це до уваги, під час дослідження лінійності цих методик немає необхідності в такій великій (9) кількості точок. Зазвичай цілком достатньо 5 (плюс 1 для стандарту — для переводу даних у нормалізовані координати).

Для кожного розчину проводять зазначену в специфікації кількість повторних хроматограм.

Діапазон методики залежить від того, в якому варіанті проводиться аналіз — методом стандартних добавок або методом зовнішнього (або внутрішнього) стандарту.

10.5.1. Метод стандарту

Як показано раніше в розділі 5.7, доцільно проводити вивчення для 5 модельних розчинів із концентраціями 25, 50, 75, 100 і 125 % до ImL . На відміну від кількісного контролю домішок (див. розділ 5), ці концентрації (модельні розчини) готують в одному, а не двох повторях. Модельні розчини готують із використанням попередньо висушеної випробовуваної речовини (для видалення ЗР) у тій самій концентрації, що й у методиці. Для підтвердження того, що розчин висушеної випробовуваної речовини не дає на хроматограмі піків, які можуть перекриватися піками ЗР, що аналізуються, готують також і контрольний розчин (0) — розчин випробовуваної речовини в тому самому розчиннику, що й у модельних розчинах (і в препараті). Необхідно також отримати хроматограму розчинника (00), щоб переконатися у відсутності на неї піків, які перекриваються піками ЗР, що аналізуються.

Зазначимо, що якщо на хроматограмі контрольного розчину (0) відсутні піки, що заважають, то необхідності в дослідженні хроматограм розчинника (00) вже немає (оскільки розчинник також входить до контрольного розчину). Але якщо на хроматограмі контрольного розчину є піки, що заважають, то хроматограма розчинника необхідна.

Крім того, для переводу в нормалізовані координати також необхідно мати ще один розчин зі 100%-ю концентрацією (st). На відміну від модельних розчинів і контрольного розчину, st готується без використання випробовуваної речовини (як і в реальному аналізі методом стандарту).

10.5.2. Метод стандартних добавок

Особливістю методу стандартних добавок є те, що він вимагає лінійності в значно ширшому діапазоні, ніж звичайний метод стандарту, оскільки передбачає додавання ЗР із номінальною концентрацією до випробовуваного зразка. Отже, якщо діапазон методу стандарту становить 25–125 % від ImL (див. вище), то в методі стандартних добавок він розширюється до 25–225 %, причому 200 % відповідає стандартному розчину за вмісту ЗР у випробовуваному зразку, який дорівнює 100 % від ImL . Ураховуючи, що кількість розчинів дорівнює 5, для дослідження лінійності доцільно брати модельні розчини з концентраціями 25, 75, 125, 175 і 225 %.

Як і в методі стандарту (див. вище), модельні розчини готують із використанням попередньо висушеної досліджуваної речовини (для видалення ЗР) у тій самій концентрації, що й у методиці. З використанням висушеної випробовуваної речовини готують і контрольний розчин (0) — для перевірки відсутності на хроматограмі піків випробовуваної речовини, що заважають. Необхідно також отримати хроматограму розчинника (00), щоб переконатися у відсутності на ній піків, які перебиваються піками ЗР, що аналізуються.

Для переводу в нормалізовані координати також необхідним є ще один розчин із 100%-ю концентрацією (st). На відміну від методу стандарту, його готують також із використанням випробовуваної речовини (як і в реальному аналізі методом стандартних добавок).

Оскільки чим ширше діапазон, тим складніше добитися необхідної лінійності і точності, то в звичайній (непарофазовій хроматографії) метод стандартних добавок є менш точним, ніж метод стандарту, і його застосування зазвичай не є доцільним.

10.6. Специфічність: вплив заважальних піків субстанції і розчинника

Під час приготування модельних розчинів для перевірки ефектів матриці необхідно використовувати випробовувану речовину. Ця речовина містить невідомі кількості ЗР, що не дозволяє приготувати модельні розчини з

відомими концентраціями ЗР. Тому для приготування модельних розчинів із субстанції необхідно видалити ЗР. Зазвичай цього досягають висушуванням у вакуумі. Однак і після цього під час валідації методики контролю ЗР часто доводиться стикатися з наявністю сторонніх піків, які перекриваються піками ЗР, що аналізуються. Це впливає на специфічність методики. Для контролю цих піків отримують хроматограми контрольного розчину (0) і розчинника, що використовують для аналізу (00). Сторонні піки заважають проведенню валідації, а також власне контролю ЗР. Поява піків, що заважають, може бути пов'язана з такими причинами.

1. З випробовуваної речовини, яка висушена для приготування модельних розчинів, не повністю видаляються ЗР, що призводить до завищення фактичного вмісту ЗР у модельних розчинах і погіршенню валідаційних характеристик.
2. Піки, що заважають, є піками домішок розчинника, який застосовується для аналізу.
3. Піки, що заважають, є піками домішок або продуктів деградації випробовуваної речовини і/або взаємодії її із розчинником.

10.6.1. Вплив залишків ЗР

Випадок 1 виникає тільки на стадії проведення валідації. Він ускладнює отримання метрологічних характеристик, але не впливає на результати контролю ЗР і ухвалення рішення про якість. Для нівелювання впливу піків, що заважають (які є піками невидалених ЗР), у цьому разі під час проведення валідації (але не власне контролю якості) з площ піків ЗР, що аналізуються, на хроматограмах стандарту (у методі стандартних добавок; у методі стандарту — ні) і модельних розчинів просто вираховують площі піків цих ЗР на хроматограмі контрольного розчину (0).

Водночас отримані метрологічні характеристики методики, що валідується, погіршуються порівнюючи зі справжніми значеннями. Зі співвідношення (10.8), зокрема, видно, що відносні стандартні відхилення площ піків модельних розчинів зростуть приблизно на стільки відсотків, скільки відсотків становлять у нормалізованих координатах площі піків ЗР на хроматограмі контрольного розчину (0). Наприклад, якщо площа піка, що заважає, на хроматограмі контрольного розчину становить у нормалізованих координатах 10 % від площі піка, який відповідає ImL , то RSD площ піків модельних розчинів зростуть в 1.1 рази (на 10 %) порівнюючи зі справжніми значеннями. Однак, якщо водночас витримуються розглянуті вище критерії, то методику можна вважати валідованою, оскільки реально її метрологічні характеристики ще кращі.

Довести, що піки, які заважають, належать саме невидаленим ЗР, можна різними способами, наприклад повторним висушуванням випробовуваної

речовини. Зменшення піків, які заважають, свідчить на користь належності їх до невидалених ЗР.

10.6.2. Вплив домішок у розчиннику і випробовуваній речовині

У випадках 2-3 ситуація інша. Ці випадки виникають як на стадії валідації, так і під час самого контролю ЗР. Оскільки апріорно ми не знаємо величини площ цих піків під час проведення контролю якості реальних об'єктів, то ми не маємо права їх вираховувати з площ піків модельних розчинів і стандарту під час проведення валідації.

Наявність піків, що заважають, на хроматограмі розчинника (00) свідчить про наявність домішок, що заважають, у розчиннику, який використовується для аналізу (вони можуть утворюватися і в результаті розкладу розчинника в процесі аналізу). Наявність піків, що заважають (які не є піками невидалених залишків ЗР), на хроматограмі контрольного розчину свідчить про наявність у випробовуваній речовині домішок, що заважають, або їх утворення в процесі хроматографування і взаємодії з розчинником.

$$\delta_j \leq \max \delta = 0.32 \cdot \Delta_{Im} = 0.32 \cdot 16 = 5.1\%. \quad (10.18)$$

Піки розчинника і випробовуваної речовини, які заважають, по-різному впливають на проведення валідації і контролю якості у випадках методу стандарту і методу стандартних добавок.

10.6.2.1. Метод стандартних добавок

У методі стандартних добавок концентрації випробовуваної речовини і розчинника (а отже, і відповідних їм домішок) у випробовуваному (або модельному) розчині і стандарті однакові. Концентрації самих ЗР, що аналізуються, відрізняються на ImL . Для площ j -го ЗР у випробовуваному і стандартному розчинах можна записати співвідношення:

метод стандартних добавок:

$$\begin{aligned} S_{ref,j} &= S_{ImL,j} + S_{test,j} = S_{ImL,j} + (S_j + S_{oj}), \\ S_{test,j} &= S_j + S_{oj}. \end{aligned} \quad (10.19)$$

Тут індекс «0» стосується контрольного розчину; «ref» стосується розчину порівняння; «test» — випробовуваного розчину; « ImL » — теоретичної площі піка, який відповідає ImL ; S_j — теоретична площа піка, яка відповідає фактичному вмісту j -го ЗР у випробовуваному розчині.

Систематична похибка визначення вмісту j -го ЗР (δ_j), яка викликана впливом домішок у розчиннику і випробовуваній речовині, у фармакопейному методі стандартних добавок являє собою змінення відношення K_{Imp} (10.1), яке

викликане наявністю цих домішок. Величина δ_j залежить від концентрації ЗР у випробовуваній речовині, зменшуючись із її ростом. Оскільки ми маємо справу з граничним випробуванням, то величину δ_j доцільно регламентувати для критичного випадку — коли концентрація ЗР у випробовуваній речовині дорівнює ImL (тобто $S_j = S_{ImL,j}$) і теоретичне значення $K_{Imp} = 0.5$. Тоді, урахувавши співвідношення (10.1, 10.18-10.19), отримаємо для j -го ЗР вимоги до площі піка ЗР на хроматограмі контрольного розчину (S_{0j}):

метод стандартних добавок:

$$\delta_j = \frac{100}{0.5} \cdot \left(\frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} - 0.5 \right) = \frac{100}{0.5} \cdot \left(\frac{S_{ImL,j} + S_{0j}}{2 \cdot S_{ImL,j} + S_{0j}} - 0.5 \right) = \frac{100 \cdot S_{0j}}{2 \cdot S_{ImL} + S_{0j}} = \frac{100 \cdot S_{0j}}{S_{ref}} \leq \max \delta = 5.1\% \quad (10.20)$$

10.6.2.2. Метод стандарту

У цьому разі концентрацію розчинника (і, відповідно, домішок, пов'язаних із ним) у випробовуваному і стандартному розчинах можна вважати однаковою, але випробовувана речовина (і пов'язані з нею домішки) присутні у випробовуваному розчині і відсутні в стандартному. Вирази для площ піків j -го ЗР, аналогічні (10.19), мають вигляд (індекс «00» стосується хроматограми розчинника):

метод стандарту:

$$\begin{aligned} S_{ref,j} &= S_{ImL,j} + S_{00j} \\ S_{test,j} &= S_j + S_{0j} \end{aligned} \quad (10.21)$$

Як і в методі стандартних добавок, у методі стандарту систематична похибка аналізу j -го ЗР (δ_j) залежить від концентрації ЗР у випробовуваній речовині, зменшуючись із її ростом. Тому її також доцільно регламентувати для критичного випадку — коли концентрація ЗР у випробовуваній речовині дорівнює ImL (тобто $S_j = S_{ImL,j}$). У цьому разі теоретичне значення відношення площ ЗР на хроматограмах випробовуваного і стандартного розчинів дорівнює 1. Тому, урахувавши співвідношення (10.18, 10.21), отримаємо, аналогічно (10.20), для j -го ЗР вимоги до площ піків ЗР на хроматограмах контрольного розчину (S_{0j}) і розчинника (S_{00j}) у методі стандарту:

метод стандарту:

$$\delta_j = 100 \cdot \left(\frac{S_{test,j}}{S_{ref,j}} - 1 \right) = 100 \cdot \frac{S_{0j} - S_{00j}}{S_{ref,j}} \leq \max \delta = 5.1\% \quad (10.22)$$

Урахувавши співвідношення (10.19) і (10.21), неважко бачити, що метод стандарту для критичного випадку (вміст ЗР у випробовуваній речовині дорівнює ImL) і за відсутності в розчинникові домішок, що заважають, є приблизно вдвічі більш чутливим до піків субстанції, які заважають, ніж метод стандартних добавок — за рахунок вдвічі меншій концентрації

стандартного розчину.

10.7. Вимоги до лінійності

Як показано в розділі 4.1, під час досліджень лінійності, прецизійності і правильності зручно працювати в нормалізованих координатах. У разі контролю домішок (див. розділ 5) концентрації виражають у відсотках до гранично допустимої за специфікацією концентрації домішки ImL (у цьому разі ЗР), а площа (або висота) піка виражається у відсотках до площі піка, який відповідає ImL .

Основні регламентовані характеристики прямої $Y = b \times X + a$ — це залишкове стандартне відхилення (SD_o), коефіцієнт кореляції (R_c) і вільний член (a).

Залишкове стандартне відхилення SD_o визначається тільки невизначеністю методики Δ_{im} і кількістю точок прямої (g) (див. співвідношення (4.15-4.16)). У нашому разі $g = 5$, $\Delta_{imp} = 16.0\%$ (див. рівняння (10.14)), тому:

$$SD_o \leq \Delta_{im} / t(95\%, g - 2) = 16 / 2.35 = 6.8\% . \quad (10.23)$$

Вимоги до коефіцієнта кореляції R_c і вільного члена a залежать від діапазону, який у методу стандарту і методу стандартних добавок різний. Тому і вимоги до них у цих методів різні.

10.7.1. Метод стандарту

10.7.1.1. Коефіцієнт кореляції

Досліджувані концентрації (25, 50, 75, 100 і 125 %) характеризуються стандартним відхиленням $SD_x = SD_{range} = 39.53\%$. Як показано (див. співвідношення (4.5)), вимоги до коефіцієнта кореляції у цьому разі, з урахуванням (10.23), даються співвідношенням:

метод стандарту:

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{SD_o^2}{SD_{range}^2}} = 0.9851. \quad (10.24)$$

10.7.1.2. Вимоги до вільного члена

1) статистично незначуща відмінність від нуля, тобто за $g = 5$:

метод стандарту:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \cdot s_a = 2.35 \cdot s_a; \quad (10.25)$$

2) у разі невиконання нерівності (10.25) (тобто a — статистично значуще відрізняється від нуля) має виконуватися практична незначущість; у

нашому разі, ураховуючи (10.12-10.13), отримаємо в нормалізованих координатах (порівняйте з рівнянням (4.18)) співвідношення:

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \Delta_{imp}}{1 - (25/100)} = \frac{0.32 \cdot 16}{0.75} = 6.8\%.$$

метод стандарту:

(10.26)

10.7.2. Метод стандартних добавок

10.7.2.1. Коефіцієнт кореляції

Досліджувані концентрації (25, 75, 125, 175 і 225 %) характеризуються стандартним відхиленням $SD_x = SD_{range} = 79.1\%$. Як показано в розділі 4.4.3.2, вимоги до коефіцієнта кореляції у цьому разі даються співвідношенням:

**метод
стандартних
добавок:**

$$R_c \geq \sqrt{1 - \frac{SD_o^2}{SD_{range}^2}} = 0.9963. \quad (10.27)$$

10.7.2.2. Вимоги до вільного члена

- 1) Статистично незначуще відхилення від нуля — див. співвідношення (10.25).
- 2) У разі невиконання співвідношення (10.25) вільний член у рівнянні $Y = b \times X + a$ є статистично значущим, що викликає систематичну похибку. Особливістю контролю вмісту ЗР методом стандартних добавок є те, що інтерес становить систематична похибка не знайденої концентрації, а величини K_{Im} із рівняння (10.1). У нормалізованих координатах у методі стандартних добавок залежність площі піка від концентрації для випробовуваного і стандартного розчину має такий вигляд ($ImL = 100\%$):

**метод
стандартних
добавок:**

$$\begin{aligned} Y_{test} &= a + b \cdot X_{test} \\ Y_{ref} &= a + b \cdot (X_{test} + ImL) = a + b \cdot (X_{test} + 100). \end{aligned} \quad (10.28)$$

Ураховуючи (10.28), а також вимоги до систематичної похибки (10.18), відносна похибка (δ_a), яка вноситься вільним членом у розрахунок відношення (10.1), дорівнює:

$$\begin{aligned} \delta_a(\%) &= 100 \cdot \left[\frac{a + b \cdot X_{test}}{a + b \cdot (X_{test} + 100)} - \frac{X_{test}}{X_{test} + 100} \right] \cdot \frac{X_{test} + 100}{X_{test}} = \\ &= \frac{100 \cdot 100 \cdot a}{Y_{ref} \cdot X_{test}} \leq \max \delta = 5.1. \end{aligned} \quad (10.29)$$

Зі співвідношення (10.29) видно, що δ_a зменшується з ростом концентрації ЗР у випробовуваному розчині (X_{test}). Використовуючи співвідношення (10.28-

10.29), близькість кута нахилу b до одиниці в нормалізованих координатах, а також малість вільного члена a , отримуємо вимоги до вільного члена в методі стандартних добавок за різних концентрацій:

$$\begin{aligned} X_{test} = 25\% : |a| &\leq 1.6\%, \\ X_{test} = ImL = 100\% : |a| &\leq 2.6\%. \end{aligned} \quad (10.30)$$

метод стандартних добавок:

Як видно, навіть для критичного випадку $X_{test} = ImL$ метод стандартних добавок встановлює (2.6 %) більш ніж в 2.5 рази більш жорсткі вимоги до практично незначущої величини вільного члена a , ніж співвідношення (10.26) методу стандарту (6.8 %). Для концентрації $X_{test} = 25\%$ від ImL (саме для цієї концентрації, як нижньої межі діапазону, наводяться вимоги (10.26)) співвідношення (10.30) дає зовсім нереальне на практиці значення $a = 1.6\%$.

Отже, на відміну від методу стандарту (10.26), виключно жорсткі вимоги (10.30) до практичної незначущості вільного члена a в методі стандартних добавок є некорисними порівнюючи зі статистичною незначущістю співвідношення (10.25). Це пов'язано з дуже великою різницею в площах піків випробовуваного і стандартного розчинів (щонайменше, удвічі).

10.8. Правильність і прецизійність

Ці характеристики знаходяться точно так само, як і для кількісного визначення — за результатами дослідження лінійності (див. розділ 4.4.3).

10.9. Робасність

Специфічність має бути підтверджена на різних колонках, на яких мають виконуватися вимоги до специфічності розділу 10.6.

10.9.1. Стабільність досліджуваних розчинів

Перевірка стабільності випробовуваного розчину і розчину порівняння є одним з елементів вивчення робасності методики і має проводитися перед початком усіх інших валідаційних досліджень. У разі контролю ЗР питання вивчення стабільності не є таким важливим, як для методик кількісного визначення (див. розділ 4) і, особливо, для методик контролю супровідних домішок методом ВЕРХ (див. розділ 5), оскільки, на відміну від останніх, ЗР у процесі зберігання не накопичуються, а самі ЗР зазвичай достатньо стійкі. Ураховуючи це, для підтвердження стабільності розчинів можна використовувати результати дослідження лінійності. Якщо всі модельні розчини готувати одночасно, то час їх аналізу в декілька разів перевищує час аналізу випробовуваної речовини за специфікацією. Тому виконання вимог

до лінійності, прецизійності і правильності є також і підтвердженням достатньої стабільності розчинів для контролю ЗР за специфікацією.

У тому разі, коли потрібна стабільність протягом тривалого часу, можна використати той самий підхід, що і під час контролю супровідних домішок (розділ 5.6.1): розчин вважають стійким, якщо знайдений у ньому вміст будь-якого із ЗР через вибраний проміжок часу відрізняється від вмісту цього ЗР у свіжоприготованому розчині не більш ніж на $\sqrt{2} \Delta_{Imp}$.

10.10. Придатність системи

На підставі результатів дослідження лінійності можна отримати і обґрунтування вимог до придатності системи за показником збіжності повторних інжекцій. Відповідно до стандартизованої схеми проведення валідації (див. розділ 4.2) кожна точка лінійної залежності отримується за умов специфікації із числом паралельних інжекцій для кожної точки (модельного розчину), яке дорівнює n_i ($n_i = 3$ для фармакопейної методики 2.4.24), і відповідним відносним стандартним відхиленням RSD_i . Оскільки число точок прямої дорівнює g (у нашому випадку $g = 5$), а число паралельних інжекцій для розчину порівняння дорівнює n_{ref} (зазвичай $n_{ref} = 3-5$), то за результатами дослідження лінійності ми можемо отримати об'єднане відносне стандартне відхилення RSD_{tot} із числом ступенів свободи f_{tot} :

$$RSD_{tot} = \sqrt{\frac{(n_{ref}-1) \cdot RSD_{ref}^2 + \sum_{i=1}^g (n_i - 1) \cdot RSD_i^2}{f_{tot}}}, \quad (10.31)$$

$$f_{tot} = (n_{ref} - 1) + \sum_{i=1}^g (n_i - 1).$$

Зокрема, для прийнятого у фармакопейній методиці 2.4.24 числа паралельних інжекцій $n_i = 3$ і рекомендованого $n_{ref} = 5$ отримаємо $f_{tot} = 14$.

Вимоги придатності системи до відносного стандартного відхилення паралельних інжекцій можна вважати підтвердженими, якщо всі величини RSD_i і RSD_{ref} задовольняють вимоги (10.10, 10.13), а об'єднане відносне стандартне відхилення RSD_{tot} значуще (за Фішером, на рівні 95 %) менше генерального значення $RSD(f = \infty) = 11.9 \%$, тобто:

$$RSD_{tot} \leq RSD(f = \infty) / \sqrt{F(95\%, \infty, f_{tot})},$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 14) \leq 8.2\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 16) \leq 8.4\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 20) \leq 8.8\%,$$

$$RSD_{tot}(f_{tot} = 22) \leq 8.9\%. \quad (10.32)$$

Важливою характеристикою придатності хроматографічної системи також є ступінь розділення (R_s) критичної пари піків. Зазвичай достатнім вважається $R_s \geq 1.0$, однак розділення до базової лінії відповідає $R_s \geq 1.5$, яке і можна рекомендувати для введення у випробування на придатність хроматографічної системи. Для перевірки цього критерію беруть «найгірший випадок». Для дуже несиметричних піків (коефіцієнт симетрії A_s виходить за рекомендовані статтею 2.2.46 межі 0.8–1.5) величина R_s має, відповідно, зростати. Зокрема, для «хвостатих» піків приблизне збільшення величини R_s дорівнює $A_s - 1$. Наприклад, для $A_s = 2.5$ можна рекомендувати величину $R_s \geq 1.5 + (2.5 - 1) = 3.0$.

Фактор симетрії A_s характеризує специфічність методики, а RSD площ піків паралельних хроматограм — збіжність отриманих результатів. Тому вимоги до них є головними вимогами придатності хроматографічної системи.

Крім того, встановлюються також загальні вимоги до придатності системи: коефіцієнт симетрії A_s має бути в межах 0.8–1.5, ефективність хроматографічної колонки (число теоретичних тарілок) має бути в зазначених межах. Ці величини характеризують якість хроматографії і не мають самостійного значення. Однак вони впливають на ступінь розділення R_s і RSD площ піків паралельних хроматограм. Якщо R_s і RSD задовольняють необхідні вимоги, то вимоги до цих характеристик можуть бути лібералізовані порівнюючи з рекомендаціями Фармакопеї. За достатньо високої чутливості на хроматограмі проявляються піки, які викликані шумом. Через ці та інші причини (викликані умовами завдання) часто також регламентується відношення «сигнал/шум» (зазвичай $S/N \geq 3-10$) і мінімум площі піка, що не враховується (для кількісних випробувань зазвичай $DRL \leq 5-10\%$, для граничних випробувань зазвичай $DRL \leq 32\%$ від ImL).

Приклад валідації методики контролю залишкових розчинників у субстанції наведений у *Прикладі 7*.