

**Вирішення проблеми
ідентифікації речовин методом
порівняння часів утримування у
хроматографії.**

Гризодуб А.И., Леонтьев Д.М., Ханін В.А.

Проблема №1

В современном фармацевтическом анализе хроматография широко используется как подтверждающий метод при проведении теста «Идентификация» в контроле качества активных фармацевтических ингредиентов и готовых лекарственных форм.

Как правило, во всех ведущих фармакопеях в качестве способа подтверждения подлинности структуры веществ, используются два метода - сравнение времен удерживания веществ и метод добавок.

Для большинства субстанций и однокомпонентных лекарственных форм проведение идентификации методом хроматографии возможно дополнить другими методами, подтверждающими подлинность вещества.

Однако, для многокомпонентных готовых лекарственных средств, хроматография может оказаться единственным сегодня доступным методом проведения идентификации компонентов. В будущем ее заменит хроматомасспектрометрия.

Но сегодня, проблема достоверности результатов, получаемых методом сравнения времен удерживания веществ, для таких случаев стоит достаточно остро.

Факторы, влияющие на избирательность идентификации хроматографическими методами

- Идентификация хроматографическими методами по временам удерживания всегда проводится путем сравнения средних величин времен удерживания веществ, полученными для испытуемого раствора и раствора сравнения.
- Нужно отметить, что эти величины **НИКОГДА** полностью не совпадают. Это проблема, поскольку разброс времен удерживания между параллельными хроматограммами, не позволяет однозначно трактовать различие или совпадение истинных времен удерживания анализа и неидентичного ему вещества. Основные причины такого разброса времен удерживания мы предполагаем следующие:

Факторы, влияющие на избирательность идентификации хроматографическими методами

- работа самой хроматографической системы
 - недостаточное уравнивание колонки перед проведением анализа (недостаточное время уравнивания, нестабильность потока подвижной фазы, неправильный выбор подвижной фазы, градиентный режим элюирования, неправильный выбор сорбента колонки, температура)
 - «Матричный эффект». Его физической причиной является различие состава раствора сравнения и испытуемого раствора.
 - Неполное элюирование компонентов препарата из колонки.
- Различием в адсорбции анализируемых веществ, если вещество в испытуемом растворе не является тождественным веществу в растворе сравнения.

ПРОБЛЕМА №2

Исходные данные для сравнения времен удерживания, как правило, получают при выполнении тестов «Идентификация», «Количественное определение», «Сопутствующие примеси». Однако требования к максимальной разнице времен удерживания или их средних величин отсутствуют в общих статьях ГФУ *2.2.46 Методи хроматографічного розділення, 2.2.28. Газова хроматографія і 2.2.29. Рідинна хроматографія.*

Ведущие фармакопеи мира - американская, британская и европейская – также не содержат указания для выполнения теста «Идентификация».

Существует практика, которая в настоящее время принимается регуляторными органами без обоснования: идентификация считается положительной, если средние значения времен удерживания различаются не более чем на 2%. Число параллельных хроматограмм не оговаривается. Такая практика не основывается на оценке риска принятия некорректного решения о соответствии спецификациям и поэтому приводит к субъективизму при проведении испытания на идентификацию.

Постановка задачи

Решение приведенных выше проблем требует ответа на следующие вопросы:

- какое количество параллельных измерений необходимо выполнить в рамках анализа для получения статистически достоверных данных (Требования для такого теста как «Идентификация» полностью отсутствуют в фармакопеях);
- какая величина дисперсии является максимально допустимой для полученного количества хроматограмм раствора сравнения и образца;
- какой критерий необходимо использовать для оценки отсутствия различия средних величин времен удерживания, и какова максимально допустимая величина этого критерия.

Полученные ответы позволят строго регламентировать требования к разделу «Идентификация» в нормативной документации, предназначенной для входного контроля субстанций и контроля готовых лекарственных средств.

Подход к нормированию

При контроле качества лекарственных средств (ЛС) применяется **«подтверждающий подход»** при проведении идентификации по временам/объемам удерживания.

Мы априорно предполагаем, что эти величины удерживания для испытуемого и стандартного образцов совпадают (с заранее определенной точностью).

Тогда относительное различие средних (в процентах к среднему для стандартного образца) не должно превышать наперед заданной величины $max dif_{ret}$

Каким же требованиям должна удовлетворять величина $max dif_{ret}$?

Статистическая незначимость различия величин удерживания

Доверительные интервалы среднего результата для испытуемого и стандартного растворов равны

$$\Delta_{sample} = t(P, n - 1) \times RSD_{sample} / \sqrt{n_{sample}}$$

$$\Delta_{st} = t(P, n_{st} - 1) \times RSD_{st} / \sqrt{n_{st}}$$

Объединенный доверительный интервал Δ_p равен

$$\Delta_p = \sqrt{\Delta_{sample}^2 + \Delta_{st}^2}$$

С учетом приведенных выше соотношений, требование статистической незначимости различий средних величин удерживания принимает вид:

$$dif_{ret} (\%) = 100 \times \frac{|\overline{x}_{sample} - \overline{x}_{st}|}{\overline{x}_{st}} \leq \max dif_{ret} = \Delta_p.$$

Недостатки требования статистической незначимости

Стандартные отклонения величин удерживания анализируемого соединения для испытуемого (s_{sample}) и стандартного (s_{st}) образцов могут значительно различаться на разных колонках и даже в разных сериях эксперимента.

Доверительные интервалы Δ_{sample} и Δ_{st} (см. соотношения (2)) зависят от числа параллельных измерений n_{sample} и n_{st} – чем последние больше, тем доверительные интервалы меньше.

Установление критериев приемлемости по экспериментальным данным после их получения противоречит самому принципу контроля качества и, фактически, является «подгонкой под эксперимент».

Поэтому ГФУ [2, раздел 5.4] вместо статистической незначимости различия средних значений рекомендует использовать подход, основанный на практической незначимости этого различия для решения поставленной задачи.

Практическая незначимость различия величин удерживания

Общее выражение для максимально допустимой неопределенности разности величин удерживания (Δ_{ret})

$$\max dif_{ret}^2 = \max \Delta_{ret}^2 = \max \Delta_{sample}^2 + \max \Delta_{st}^2 + \max \Delta_{matrix}^2$$

Поскольку при контроле качества лекарственных средств применяется подтверждающий подход, то $x_{sample} = x_{st}$.

$$\max \Delta_{sample} = \max \Delta_{st}.$$

$$\max dif_{ret}^2 = \max \Delta_{ret}^2 = 2 \times \max \Delta_{st}^2 + \max \Delta_{matrix}^2$$

В общем случае, применение идентификации по величинам удерживания предполагает незначимость матричных эффектов

$$\max \Delta_{matrix}^2 \leq 0.32 \times 2 \times \max \Delta_{st}^2 = 0.64 \times \max \Delta_{st}^2$$

$$\max dif_{ret} = \sqrt{2} \times \max \Delta_{st} = 1.41 \times \max \Delta_{st}.$$

Максимально допустимая неопределенность величин удерживания и максимально допустимое различие величин удерживания

Для расчета максимально допустимой неопределенности величин удерживания стандартного образца ($\max \Delta_{st}$) логично использовать паспортные значения хроматографа

$$\max \Delta_{st} \leq \max \Delta_{cert} = t(P, n_{cert} - 1) \times RSD_{cert} / \sqrt{n}$$

Величина $\max \Delta_{cert}$ зависит от числа параллельных инъекций n , уменьшаясь с его ростом. Поскольку предполагается, что $n \geq 3$, то необходимо проводить расчеты критерия для $n = 3$.

Учитывая вышесказанное и полагая также $P = 95\%$, из уравнения (11) получим:

$$\max \Delta_{st} = 2.26 \times RSD_{cert} / \sqrt{3} = 1.31 \times RSD_{cert}.$$

$$\max dif_{ret} = \sqrt{2} \times \max \Delta_{st} = 1.41 \times 1.31 \times RSD_{cert} = 1.85 \times RSD_{cert}.$$

Требования к пригодности хроматографической системы

Для максимально допустимой неопределенности $\max \Delta_{st}$ требования пригодности хроматографической системы для растворов испытуемого или стандартного образцов при произвольном числе параллельных инъекций (обычно 3-6).

$$\Delta_{sample} = t(P, n - 1) \times RSD_{sample} / \sqrt{n_{sample}}$$

$$\Delta_{st} = t(P, n_{st} - 1) \times RSD_{st} / \sqrt{n_{st}}$$

$$\max \Delta_{sample} = \max \Delta_{st}.$$

$$\max \Delta_{st} = 2.26 \times RSD_{cert} / \sqrt{3} = 1.31 \times RSD_{cert}.$$

$$RSD_{st} \leq \max RSD_{st} = \frac{1.31 \times RSD_{cert} \times \sqrt{n_{st}}}{t(95\%, n_{st} - 1)}.$$

$$RSD_{sample} \leq \max RSD_{sample} = \frac{1.31 \times RSD_{cert} \times \sqrt{n_{sample}}}{t(95\%, n_{sample} - 1)}.$$

Требования к пригодности хроматографической системы

Зависимость максимально допустимых относительных стандартных отклонений величин удерживания ($maxRSD$), максимально допустимой неопределенности величин удерживания ($max\Delta_{st}$) и максимально допустимого различия величин удерживания ($maxdif_{ret}$) от сертифицированного значения RSD_{cert} и числа параллельных инъекций n

RSD_{cert} %	$max\Delta_{st}$ %	$maxdif_{ret}$ %	$maxRSD(\%)$ для числа параллельных инъекций n				
			2	3	4	5	6
0.2	0.26	0.37	0.03	0.11	0.16	0.21	0.25
0.4	0.52	0.74	0.06	0.21	0.33	0.42	0.50
0.6	0.79	1.11	0.09	0.32	0.49	0.63	0.75
0.8	1.05	1.48	0.12	0.42	0.66	0.84	1.00
1.0	1.31	1.85	0.15	0.53	0.82	1.06	1.25
1.2	1.57	2.22	0.17	0.63	0.99	1.27	1.50
1.4	1.83	2.59	0.20	0.74	1.15	1.48	1.75

Применение критериев в НД

Для введения в раздел «Пригодность хроматографической системы» НД на ЛС максимально допустимого различия величин времени удерживания ($maxdif_{ret}$) требуется одновременное введение в спецификацию требований к $maxRSD$ для фиксированного числа параллельных инъекций (n).

Однако введение в спецификацию указанных требований возможно только после определения сертифицированного значения относительного стандартного отклонения (RSD_{cert}).

Рекомендуется брать RSD_{cert} из данных по квалификации хроматографа.

Схема эксперимента

Получают по $n_{sample} \geq 3$ параллельных инъекций испытуемого раствора и $n_{st} \geq 3$ раствора стандартного образца.

Рассчитывают для этих растворов n_{sample} и n_{st} величин времен удерживания ($x_{sample,i}$ и x_i^{st}), их относительные стандартные отклонения (RSD_{sample} и RSD_{st}) и средние величины.

Относительное различие средних (в процентах к среднему для стандартного образца) не должно превышать наперед заданной величины $\max dif_{ret}$ (табличные данные).

$$dif_{ret}(\%) = 100 \times \frac{|\overline{x_{sample}} - \overline{x_{st}}|}{\overline{x_{st}}} \leq \max dif_{ret}.$$

ГФУ

Введение разработанных параметров в раздел 2.2.46 ГФУ является одной из самых насущных задач в ближайшей перспективе, поскольку использование идентификации веществ методом сравнения времен их удерживания все более широко используется в спецификациях на ЛС.

Модификация раздела 2.2.46 ГФУ необходима также по причине отсутствия описания методов идентификации веществ хроматографическими методами и требований к их использованию.

**Спасибо за
внимание**