

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2017

Н. А. Эпштейн

ОБ АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ В ФАРМАЦИИ: МЕТОД БАЛАНСА МАСС

Автономное объединение "ШТАДА ФармДевелопмент" АО "НИЖФАРМ", Россия, 109029, Москва, Автомобильный проезд, д. 6.

В обзоре критически рассмотрены подходы для аттестации субстанций как стандартных образцов (СО) методом баланса масс и ограничения, которые надо учитывать при использовании этого метода. Приведены формулы, необходимые для оценки неопределенности аттестованного значения СО. В том числе предложены отсутствующие в литературе формулы: а) для оценки неопределенности значения содержания органических примесей, получаемых методом нормализации площадей (высот) пиков с поправочными коэффициентами; б) для оценки неопределенности, связанной с пределом обнаружения органических примесей. Приведены рекомендации для корректной аттестации субстанций методом баланса масс.

Ключевые слова: стандартные образцы; аттестация; неопределенность; метод баланса масс; рекомендации; фармация.

В литературе имеется сравнительно немного работ, посвященных аттестации стандартных образцов (СО) для фармацевтического применения. Наиболее важные рекомендации по аттестации СО, предназначенных для контроля качества лекарственных препаратов и субстанций, приведены в Европейской фармакопее [1] и в руководстве по валидации В. А. Н. [2]. Рекомендации по аттестации СО приведены в работах [3 – 7] и в [9 – 12], а также в фармакопее США, где имеется раздел <11> "USP Reference Standards" [8], однако в нем рассматриваются только стандарты USP RS. Есть также рекомендации по аттестации СО в общегосударственных нормативных документах ГОСТ, РМГ, ISO [13 – 16]. Эти нормативные документы предусматривают комплекс специальных, дорогостоящих межлабораторных исследований для аттестации СО. В фармакопейном анализе такие исследования трудно не только окупить, но и организовать их проведение в достаточном количестве аттестованных лабораторий. Следует отметить, что в них содержатся требования, слишком строгие к аттестации СО, как правило, избыточные для аттестации СО в фармации. Имеется руководство Р 50.2.058-2007 ГСИ [17] по оценке неопределенностей аттестованных значений СО веществ и материалов; его можно рассматривать как дополнение к РМГ 93-2009 ГСИ [15], так как в нем более подробно рассмотрена оценка неопределенностей аттестованных значений СО веществ и материалов.

Для аттестации СО в фармации чаще всего применяют 3 метода: 1) аттестация СО как вторичных СО с использованием первичных (обычно фармакопейных) СО, 2) аттестация СО методом баланса масс и 3) аттестация СО титриметрическим методом.

Особенный интерес представляет метод баланса масс, так как именно он рассматривается в Европейской фармакопее как основной метод аттестации СО [1]. К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых метод баланса масс применяли при аттестации лекарственных субстанций как СО [18 – 27]. В них, а также в публикациях [2, 9 – 12] приводятся разные расчетные формулы для определения содержания основного вещества в СО и для оценки неопределенности аттестованного значения СО; это затрудняет выбор необходимых формул и оценку достаточности проведенных исследований. Ни в одной из публикаций не обсуждаются ограничения, которые необходимо учитывать при использовании метода баланса масс при аттестации СО. Перечисленные факторы могут привести к неполной или даже к некорректной аттестации СО.

Цель статьи — рассмотреть основные подходы к аттестации СО методом баланса масс и необходимые расчетные формулы; указать ограничения при использовании метода баланса масс и дать рекомендации для повышения надежности аттестованных значений (assign value) СО.

Общие сведения

Современная классификация СО, учитывающая их особенности, приведена в [7]. В [1, 2, 7] подробно рассмотрена документация, необходимая для аттестации лекарственных субстанций в качестве СО. На практике при аттестации субстанции в качестве СО, как правило, выбирают серию субстанции из серий с наименьшим содержанием органических примесей, удовлетворяющую спецификации по всем показателям. Из выбранной серии субстанции отбирают и анализируют не менее 5 проб [28]. Проводят необходимые вычисления содержания

основного вещества в аттестуемом образце субстанции. Проверяют эквивалентность значения, вычисленного методом баланса масс, с результатом, полученным прямым методом (обычно титриметрическим). Присваивают образцу аттестованное значение и вычисляют его неопределенность. Отметим, что содержание основного вещества в СО, в отличие от субстанций, указывают без пересчета на сухое вещество, то есть “как есть” (“as it is”). При этом для гигроскопичных СО, как правило, предусматривают сушку (удаление влаги) при определенных условиях перед использованием для анализов, а аттестуемое значение приписывают высушенному стандартному образцу [1, 8].

1. Вычисление аттестованного значения СО методом “баланса масс”

Метод “баланса масс” основан на законе сохранения массы и заключается в следующем. Для получения аттестованного значения содержания основного вещества в СО (P_{Att}) из 100 % вычитают содержание всех “примесей” — органических примесей, воды, остаточных органических растворителей и неорганических примесей — и получают содержание основного вещества “as it is”, то есть “как есть” в процентах:

$$P_{Att} = 100 - X_{RelSub} - X_W - X_R - X_{InogSub}, \quad (1)$$

где X_{RelSub} — содержание органических примесей (как правило, определяется хроматографическим методом с использованием внутренней нормализации площадей пиков с поправочными коэффициентами); X_W — содержание воды (по К. Фишеру); X_R — содержание остаточных органических растворителей (метод ГЖХ); $X_{InogSub}$ — содержание неорганических примесей. Все X_i — средние значения не менее чем для 5 проб аттестуемой субстанции в %.

В работе [2] и многих других публикациях используется альтернативная формула для расчета содержания основного вещества по методу баланса масс:

$$P_{Att} = P_o \frac{100 - X_W - X_R - R_{InogSub}}{100}, \quad (2)$$

где P_o — средний результат определения содержания основного вещества в аттестуемой субстанции методом нормализации площадей (высот) пиков с поправочными коэффициентами. Иногда в качестве P_o используют хроматографическую чистоту пиков, то есть метод нормализации без поправочных коэффициентов; однако такой способ несет высокий риск некорректной аттестации СО и, поэтому, требует привлечения дополнительных методов типа дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и ЯМР; при этом аттестованное значение СО представляют в виде усредненного значения содержания основного вещества в СО, полученного хроматографическим и другими методами, например, см. [24].

На практике в большинстве случаев нет необходимости при аттестации СО учитывать все слагаемые в формулах (1) и (2). Чаще всего можно не учитывать содержание неорганических примесей $X_{InogSub}$ [2]. Кроме того, с практической точки зрения, можно не учитывать также содержание органических растворителей и/или воды, если их вклад не превышает 0,05 или 0,1 % в сумме. Соответственно, можно не учитывать вклад таких слагаемых в неопределенность аттестованного значения, а это существенно сокращает объем работ и финансовые затраты при аттестации СО.

Теоретически при одинаковых значениях содержания “примесей” наиболее точное значение P_{Att} должно получаться по формуле (1). В то же время расчеты показали, что различие результатов, получаемых по формулам (1) и (2), незначительно и не превышает 0,1 %, если содержание органических примесей $X_{RelSub} \leq 1,0$ % и суммарное содержание воды (включая кристаллизационную) и остаточных органических растворителей $X_W + X_R \leq 10,0$ %, или $X_{RelSub} \leq 2$ % и $X_W + X_R \leq 5$ %; то есть в большинстве случаев этим различием можно пренебречь. Исключение — субстанции типа кристаллогидратов и сольватов, а также сильно гигроскопичные субстанции. Если при их аттестации в качестве СО хотят использовать формулу (2), то сначала следует провести расчеты содержания основного вещества по формулам (1) и (2) и убедиться, что различие между результатами не превышает 0,1 %. В противном случае не рекомендуется использовать формулу (2).

Метод баланса масс, помимо строгой теоретической основы, имеет важное преимущество по сравнению с другими методами аттестации СО. При аттестации субстанций методом баланса масс значение содержания основного вещества в СО — P_{Att} а priori никогда не может превысить 100 %. Следовательно, не может быть неприятных ситуаций, нередко встречающихся при других способах аттестации СО, когда оказывается, что P_{Att} формально превышает 100 %, а это физически невозможно. В таких случаях вынуждены либо формально присваивать СО значение $P_{Att} = 100,0$ %, что справедливо вызывает сомнение у потребителей СО, если они видят в спецификации на СО сумму примесей $\geq 0,06$ % (т.е. $P \leq 99,94$ % < 100,0 % по правилу округления), либо проводить дополнительные анализы, а это значительно увеличивает затраты на аттестацию СО.

Наряду с преимуществом, упомянутым выше, метод баланса масс имеет существенное ограничение, связанное с необходимостью учета поправочных коэффициентов при определении содержания примесей хроматографическими методами. Дело в том, что, строго говоря, метод баланса масс требует учета поправочных коэффици-

ентов всех примесей при определении суммы органических примесей X_{RelSub} . Очевидно, что это требование в подавляющем большинстве случаев невозможно выполнить. Следовательно, всегда имеется риск получения некорректного значения содержания основного вещества в аттестуемой субстанции из-за того, что не учтены поправочные коэффициенты каких-то примесей. Для минимизации вышеупомянутого риска, и в то же время разумного ограничения объема дополнительных исследований, можно использовать следующий прием:

Во-первых, определять поправочные коэффициенты не для всех примесей, а только для тех, которые: а) являются “примесями повышенного риска”: при рабочей длине волны практически не поглощают или имеют абсорбцию сопоставимую по величине с абсорбцией основного вещества, что указывает на большое отличие поправочного коэффициента от 1 (эти примеси можно определять с помощью диодно-матричного детектора — по спектру в максимуме пика примеси), б) должны быть идентифицированы в соответствии с ICH ([29]; это примеси, содержание которых больше 0,1 % — при суточной дозе препарата ≤ 2 г, или больше 0,05 % — при суточной дозе препарата > 2 г — “идентифицируемые примеси”). Для отнесения примесей к идентифицируемым достаточно использовать метод нормализации без поправочных коэффициентов.

Во-вторых, оценивать эквивалентность результатов определения содержания основного вещества в аттестуемой субстанции, полученных методом баланса масс и прямым методом (как правило, титрованием), постепенно вводя поправочные коэффициенты до достижения эквивалентности — итерационный подход. Предлагаемый итерационный подход заключается в следующем. По методике определения примесей, используемой при контроле качества аттестуемой субстанции, определяют содержание примесей X_{RelSub} с теми поправочными коэффициентами (если они есть), которые указаны в этой методике. Затем методом баланса масс вычисляют P_{Att} ; проверяют эквивалентность значения P_{Att} и результата определения содержания основного вещества в аттестуемой субстанции прямым методом P_{Dir} . Для прямого метода значение P_{Dir} рекомендуется получать вычитанием суммы органических примесей из результата прямого определения содержания основного вещества; соответствующая этой рекомендации формула для титриметрических методов приведена в работе ([2], p. 156). Если P_{Att} и P_{Dir} эквивалентны, то СО присваивают аттестованное значение P_{Att} . Если установлено, что P_{Att} и P_{Dir} неэквивалентны, то поступают следующим образом. Последовательно определяют и учитывают при расчете X_{RelSub} поправочные коэффициенты сначала для “примесей повышенного риска”, затем для примесей с наибольшим процентным содержанием (по результатам нормализации без поправочных коэффициентов), постепенно увеличивая количество примесей, для которых учтены поправочные коэффициенты — до получения эквивалентности результатов определения содержания примесей методом баланса масс P_{Att} и прямым методом P_{Dir} . Стандартному образцу присваивают аттестованное значение P_{Att} только после достижения эквивалентности P_{Att} и P_{Dir} . Подчеркнем, что достаточно провести вышеизложенную процедуру 1 раз и затем использовать метод баланса масс (с необходимыми поправочными коэффициентами) для аттестации СО без определения P_{Dir} .

Для оценки эквивалентности значений содержания основного вещества, полученных методом “баланса масс” P_{Att} и прямым методом, как правило, титрованием — P_{Titr} , можно использовать 2 способа. Первый — общеизвестный способ “сравнения 2 средних” — по F -критерию Фишера и t -критерию Стьюдента [28, с. 121] или методом однофакторного ANOVA, легко выполняемого в Excel [30]. Этим способам следует отдавать предпочтение, так как они являются теоретически обоснованными. Однако эти способы иногда могут дать отрицательный результат в случае неблагоприятного соотношения случайных и систематических ошибок. Поэтому, если различие P_{Att} и P_{Titr} практически незначимо, например, меньше, чем 0,32 В (см. пояснение к формуле (3)), можно использовать более сложный, альтернативный подход, рассмотренный в [9, 11]. Он заключается в следующем. При присвоении аттестованного значения методом “баланса масс” P_{Att} проверяют, что “стыкуются” результаты определения содержания основного вещества, найденные методом “баланса масс” и титрования. Для этого вычисляют неопределенность аттестованного значения U_{Att} , из экспериментальных результатов титрования, рассчитывают средний результат \bar{X}_{Titr} и неопределенность содержания основного вещества U_{Titr} . Затем проверяют выполнение для полученных результатов следующих соотношений:

$$U_{\text{Att}} \leq \max \Delta_{\text{As}} = 0,32B, \quad (3)$$

$$U_{\text{Titr}} \leq U_{\text{Att}}; |\bar{X}_{\text{Titr}} + (X_{\text{RelSub}} + X_{\text{W}} + X_{\text{R}} + X_{\text{InorSub}})] - 100| = |\bar{X}_{\text{Titr}} - P_{\text{Att}}| \leq U_{\text{Att}}, \quad (4)$$

где $\max \Delta_{\text{As}}$ — максимально допустимая неопределенность количественного определения; $B = 100 - B_{\text{H}} \%$, B_{H} — верхняя граница нормируемого содержания основного вещества в аттестуемой субстанции в процентах. Выполнение условий (3) и (4) фактически является упрощенным требованием к эквивалентности P_{Att} и P_{Titr} , тем не менее оно достаточно при аттестации СО методом “баланса масс” и может быть использовано на практике.

2. Применение методов ЯМР и ДСК — альтернативные подходы к аттестации СО методом баланса масс

Следует отметить, что имеются публикации, в которых для определения содержания основного вещества и примесей (X_{RelSub}) в аттестуемых субстанциях применяют ЯМР [18, 22, 27] или ДСК [19, 21, 23, 25]. При этом

метод ДСК используют как прямой метод определения X_{RelSub} , а метод ЯМР — как косвенный: из 100 % вычитают содержание основного вещества, рассчитанное по данным ЯМР. Затем вычисляют P_{Att} методом баланса масс. Для аттестации СО ЯМР и ДСК применяют сравнительно редко. Это не удивительно, поскольку ЯМР и ДСК имеют не меньшие ограничения при определении примесей, чем хроматографические методы, что нивелирует их преимущества перед хроматографическими методами. Ограничением ЯМР при определении содержания примесей является необходимость установления и использования при расчетах только неперекрывающихся сигналов молекулы основного вещества и молекул примесей. Это сложная задача, связанная с риском неправильного определения X_{RelSub} , если неизвестны структуры каких-то примесей. В случае ДСК корректное определение примесей возможно только, если в аттестуемой субстанции достаточно высокое содержание основного вещества (как правило, не менее 99,0 мол. %) и в ней отсутствуют твердые растворы примесей [31, 32]. В связи с этим обычно контролируют результат определения примесей методом ДСК с помощью хроматографической оценки содержания примесей и берут среднее значение, полученное этими методами.

3. Возможность и ограничение использования потери массы при высушивании вместо суммы X_W и X_{ResSol}

Важно отметить, что для метода баланса масс в Европейской фармакопее и других руководствах допускается использовать потерю массы при высушивании (X_D) в формулах (1) и (2) вместо суммы значений содержания воды по К. Фишеру (X_W) и остаточных органических растворителей (X_{ResSol}). В то же время из термогравиметрического анализа известно, что некоторые субстанции могут содержать сильно удерживаемую капиллярно связанную воду [31], которую невозможно удалить нагреванием, в том числе при условиях, нормируемых в фармакопеех для показателя “Потеря массы при высушивании”. Содержание такой воды может быть сравнимо с содержанием органических примесей в субстанции. Поэтому при аттестации СО, предназначенных для определения содержания основного вещества в субстанциях, надо оценивать допустимость замены суммы X_W и X_R на X_D . Такую оценку достаточно сделать 1 раз — при разработке методики аттестации СО. Для этого можно использовать статистический метод “сравнения 2 средних” — по F -критерию Фишера и t -критерию Стьюдента [28, с. 121], метод однофакторного ANOVA [30], или оценивать незначимость различия между потерей массы при высушивании и суммой содержания воды и остаточных органических растворителей, в %, в соответствии с условием:

$$|(X_D - (X_{\text{ResSol}} + X_W))| \leq \max \Delta_{\text{As}}, \quad (5)$$

где $\max \Delta_{\text{As}}$ — максимально допустимая неопределенность количественного определения в соответствии с формулой (3).

4. Вычисление неопределенности аттестованного значения СО

В настоящее время неопределенность аттестованного значения СО обычно вычисляют как расширенную неопределенность [15 – 17, 33 – 38], основанную на “принципе неопределенности”. Как известно, введение и использование неопределенности вместо погрешности связано со “стремлением уйти от неопределимых на практике величин, таких, как погрешность (в англоязычной литературе — error) и истинное значение” [39], а также с прослеживанием и учетом источников ошибок.

Нередко на этикетках, а иногда в паспортах, на СО приводят, наряду с аттестованным значением содержания основного вещества P_{Att} через запятую, а не через \pm , значение неопределенности u и далее, через запятую — значение коэффициента охвата (см. ниже); использование запятой отражает то, что P_{Att} не может превышать 100 %. Отметим, что согласно [1, пункт 4.2.4] для СО можно не указывать значение неопределенности на этикетках и паспортах. В этом же пункте приводится также важный критерий приемлемости для значения P_{Att} : “если вычисленная неопределенность меньше заранее установленного значения, которое рассматривается как незначительное по отношению к критерию применимости для количественного определения, то значение P_{Att} принимается”.

Обобщенную формулу для вычисления расширенной неопределенности U_{Att} аттестованного значения СО, полученного методом баланса масс, можно представить как [3, 15, 17, 24, 25, 38, 40 – 43]:

$$U_{\text{Att}} = k \sqrt{U(X_{\text{Att}})^2 + U(\text{Hom})^2 + U(\text{Stab})^2}, \quad (6)$$

где k — коэффициент охвата; $U(\text{Hom})$ и $U(\text{Stab})$ — стандартные неопределенности, полученные при оценке однородности содержания (гомогенности) основного вещества в пробах аттестуемой субстанции и при оценке ее стабильности, а $U(X_{\text{Att}})$ — комбинированная неопределенность содержания основного вещества в аттестуемой субстанции, выраженная через корень квадратный из суммы квадратов стандартных неопределенностей слагаемых в формуле (1), и неопределенности, связанной с пределом обнаружения примесей $U(\text{LOD})$ [24]:

$$U(X_{\text{Att}}) = \sqrt{U(X_{\text{RelSub}})^2 + U(X_W)^2 + U(X_R)^2 + U(X_{\text{InorSub}})^2 + U(\text{LOD})^2}. \quad (7)$$

В формуле (6) обычно используют рекомендованное значение коэффициента охвата $k = 2$ (см. [33, раздел 2.3.3]) и часто не задумываются, оправдано ли $k = 2$ или нет, а это может приводить к некорректной оценке расширенной неопределенности как при аттестации СО, так и при оценке результатов любых анализов. Дело в том, что значение коэффициента охвата k может оказаться существенно большим, если анализируют менее 6 проб. В таких случаях рекомендуем уточнять значение коэффициент охвата. Это можно сделать в соответствии с [15, 17], следующим образом.

Предварительно рассчитывают число эффективных степеней свободы v_{eff} по специальному уравнению Welch – Satterthwaite [15, 17, 44]:

$$v_{\text{eff}} = \frac{U_{\text{Att}}^4}{\frac{U(X_{\text{Att}})^4}{v(X_{\text{Att}})} + \frac{U(\text{Hom})^4}{v_{\text{Hom}}} + \frac{U(\text{Stab})^4}{v_{\text{Stab}}}}, \quad (8)$$

где U_{Att} — расширенная неопределенность аттестованного значения, вычисляемая по формуле (6); в знаменателе: $U(X_{\text{Att}})$ — комбинированная неопределенность содержания основного вещества в аттестуемой субстанции, формула (7); $U(\text{Hom})$ и $U(\text{Stab})$ — стандартные неопределенности соответственно при оценке гомогенности — формулы (25), (26) и при оценке стабильности — формула (28); v — число степеней свободы: $v(X_{\text{Att}})$ — при определении содержания основного вещества, v_{Hom} и v_{Stab} — при оценке однородности распределения (содержания) основного вещества во флаконах и стабильности аттестуемой субстанции, соответственно. После вычисления v_{eff} для определения коэффициента охвата k используют общеизвестную таблицу зависимости критерия Стьюдента от числа степеней свободы: находят значение двухстороннего критерия Стьюдента при $v = v_{\text{eff}}$ для заданной доверительной вероятности P (обычно 95 %). В качестве примера значения коэффициента охвата существенно превышающего 2, можно сослаться на публикацию [44], в которой титровали 5 образцов, вычислили, что $v_{\text{eff}} = 6$ и определили по таблице критерия Стьюдента значение коэффициента охвата для 6 степеней свободы — 2,45. Заметим, что при обычной статистической обработке экспериментальных данных титрования в случае 5 образцов ($n = 5$) число степеней свободы было бы $v = n - 1 = 4$.

Следует подчеркнуть, что при аттестации СО по формуле (2) оценка расширенной неопределенности аттестуемого значения СО более простая, чем по формуле (1), так как в случае использования формулы (1) требуется более сложный расчет вклада поправочных коэффициентов. Возможно, по этой причине формулу (2) применяют чаще, чем формулу (1). Примеры расчета расширенной неопределенности аттестуемого значения СО приведены в [18 – 25, 34, 38].

4.1. Оценка U_{Att} при определении содержания основного вещества в СО по формуле (1). В этом случае наибольшую трудность представляет оценка комбинированной неопределенности содержания органических примесей $U(X_{\text{RelSub}})$. Приведем необходимые формулы для оценки U_{Att} в соответствии с (6) и (7).

4.1.1. Расчет комбинированной неопределенности $U(X_{\text{RelSub}})$ значения содержания органических примесей X_{RelSub}

Формулу для определения содержания органических примесей методом нормализации площадей пиков с поправочными коэффициентами можно представить в упрощенном виде:

$$X_{\text{RelSub}} = \frac{100 \sum f_i S_i}{\sum f_i S_i + S_0} \approx \frac{100 \sum f_i S_i}{S_0}, \quad (9)$$

где S_0 — площадь пика основного (лекарственного) вещества; f_i и S_i — поправочный коэффициент и площадь пика примеси i .

Тогда комбинированную неопределенность $U(X_{\text{RelSub}})$ значения X_{OrgImp} можно вычислить в соответствии с (9) с использованием следующих формул:

$$U(X_{\text{RelSub}}) = X_{\text{RelSub}} \sqrt{\left(\frac{U(\sum f_i S_i)}{\sum f_i S_i}\right)^2 + \left(\frac{U(S_0)}{S_0}\right)^2}, \quad (10)$$

$$U(\sum f_i S_i) = \sqrt{\sum U(f_i S_i)^2}, \quad (11)$$

$$U(f_i S_i) = f_i S_i \sqrt{\left(\frac{U(f_i)}{f_i}\right)^2 + \left(\frac{SD_{S_i}}{S_i}\right)^2}, \quad (12)$$

$$U(f_i) = f_i \frac{SD_{S_{f_i}}}{S_{f_i}} [45], \quad (13)$$

$$U(S_o) = SD_{S_o}, \quad (14)$$

где U — стандартная неопределенность параметра, указанного в скобках; SD_{S_i} и SD_{S_o} — стандартные отклонения площадей пиков примеси i , и основного вещества, полученные в ходе определения содержания органических примесей в аттестуемой субстанции; $SD_{S_{f_i}}$ — стандартное отклонение площадей пиков S_{f_i} примеси i , полученное в ходе определения поправочного коэффициента f_i . Эти стандартные отклонения вычисляются по формуле:

$$SD_n = \frac{\sum_{j=1}^n (n_j - 1) SD_j^2}{\nu}; \quad \nu = \sum_{j=1}^n (n_j - 1), \quad (15)$$

где SD_n — стандартное отклонение, рассчитываемое по результатам анализа n проб; n_j и SD_j — число параллельных определений при анализе j -й пробы и стандартное отклонение результатов анализа j -й пробы; ν — число степеней свободы.

4.1.2. Расчет комбинированной неопределенности $U(X_{ResSol})$ значения содержания остаточных органических растворителей X_{ResSol}

Содержание i -го растворителя (X_i) в ppm в субстанции обычно рассчитывают в соответствии с формулой типа:

$$X_i = \frac{S_i a_{0i} D_i 10^6}{S_{0i} a_i D_{0i}}, \quad (16)$$

где S_i — площадь пика растворителя на хроматограмме испытуемого раствора; S_{0i} — площадь пика растворителя на хроматограмме стандартного раствора; a_{0i} — навеска СО растворителя i в мг; a_i — навеска субстанции в мг при определении растворителя i ; D_{0i} — разведение при приготовлении стандартного раствора растворителя i ; D_i — разведение при приготовлении испытуемого раствора.

Из формулы (16) удален множитель $P/100$, предназначенный для учета содержания основного вещества в СО растворителя, поскольку он практически не оказывает влияния на значение неопределенности X_i .

В соответствии с (16) для расчета комбинированной неопределенности значения содержания остаточных органических растворителей $U(X_R)$ используется формула (17) [24]:

$$U(X_R) = X_i \sqrt{\left(\frac{U(S_i)}{S_i}\right)^2 + \left(\frac{U(S_{0i})}{S_{0i}}\right)^2 + \left(\frac{U(a_i)}{a_i}\right)^2 + \left(\frac{U(a_{0i})}{a_{0i}}\right)^2 + \left(\frac{U(D_i)}{D_i}\right)^2 + \left(\frac{U(D_{0i})}{D_{0i}}\right)^2}, \quad (17)$$

где $U(S_i)$, $U(S_{0i})$, $U(a_i)$ и $U(a_{0i})$ — стандартные отклонения параметров, приведенных в скобках, $U(D_i)$ и $U(D_{0i})$ — корень квадратный из суммы квадратов стандартных неопределенностей мерных колб, пипеток, цилиндров, используемых при приготовлении испытуемого и стандартного растворов, соответственно.

4.1.3. Расчет комбинированной неопределенности $U(X_W)$ значения содержания воды X_W

Содержание воды в аттестуемой субстанции определяют титрованием по К. Фишеру. Используют 2 варианта: кулонометрический или потенциометрический (объемный). Для вычисления неопределенности содержания воды в аттестуемой субстанции обычно достаточно ограничиться простыми расчетными формулами определения воды [47].

Кулонометрический метод

Расчетная формула:

$$X_W = \frac{(m_W - m_{\text{blank}})}{m_{\text{sample}}} \cdot 100, \quad (18)$$

где X_W — содержание воды, определенное кулонометрическим титрованием, в %; m_W — количество воды, определенное в образце, мг; m_{blank} — количество воды, определенное при титровании бланка, мг; m_{sample} — масса образца субстанции, мг.

Комбинированная неопределенность результата определения содержания воды в аттестуемой субстанции кулонометрическим методом $U(X_W)$ [24]:

$$U(X_W) = X_W \sqrt{\left(\frac{U(m_W)}{m_W}\right)^2 + \left(\frac{U(m_{\text{balnk}})}{m_{\text{balnk}}}\right)^2 + \left(\frac{U(m_{\text{sample}})}{m_{\text{sample}}}\right)^2}, \quad (19)$$

где под корнем U — стандартные неопределенности (стандартные отклонения) параметров, указанных в скобках.

Потенциометрический (объемный) метод

Расчетная формула:

$$X_W = \frac{F(V_{\text{sample}} - V_{\text{balnk}})}{m_{\text{sample}}} \cdot 100, \quad (20)$$

где X_W — содержание воды, определенное потенциометрическим (объемным) методом в %; F — титр реагента К. Фишера, мг/мл; V_{sample} — объем реагента К. Фишера, израсходованный на титрование образца субстанции, мл; V_{balnk} — объем реагента К. Фишера, израсходованный на титрование бланка, мл; m_{sample} — масса образца субстанции, мг.

Комбинированная неопределенность результата определения содержания воды в аттестуемой субстанции потенциометрическим (объемным) методом $U(X_W)$:

$$U(X_W) = X_W \cdot \sqrt{\left(\frac{U(F)}{F}\right)^2 + \left(\frac{U(V_{\text{sample}})}{V_{\text{sample}}}\right)^2 + \left(\frac{U(V_{\text{balnk}})}{V_{\text{balnk}}}\right)^2 + \left(\frac{U(m_{\text{sample}})}{m_{\text{sample}}}\right)^2}, \quad (21)$$

где под корнем U — стандартные неопределенности (стандартные отклонения) параметров, указанных в скобках.

4.1.4. Расчет комбинированной неопределенности значения содержания неорганических примесей (золы)

$U(X_{\text{InorSub}})$

Расчетная формула:

$$X_{\text{InorSub}} = \frac{m_{\text{ash}}}{m_{\text{sample}}} \cdot 100, \quad (22)$$

где X_{InorSub} — содержание неорганических примесей в аттестуемой субстанции, %; m_{sample} — масса образца субстанции для определения золы, мг; m_{ash} — масса золы, мг.

Комбинированная неопределенность результата определения содержания неорганических примесей (золы) в аттестуемой субстанции:

$$U(X_{\text{InonSub}}) = X_{\text{InonSub}} \sqrt{\left(\frac{U(m_{\text{sample}})}{m_{\text{sample}}}\right)^2 + \left(\frac{U(m_{\text{ash}})}{m_{\text{ash}}}\right)^2}, \quad (23)$$

где под корнем U — стандартные неопределенности (стандартные отклонения) параметров, указанных в скобках.

4.1.5. Расчет неопределенности, связанной с пределом обнаружения органических примесей $U(\text{LOD})$

При оценке неопределенности результата определения органических примесей $U(X_{\text{RelSub}})$ хроматографическими методами надо учитывать также неопределенность, связанную с пределом обнаружения примесей $U(\text{LOD})$ [24]. Неопределенность бывает 2 типов: *A* и *B*. Неопределенность по типу *A* оценивают статистическими методами; ее всегда выражают через стандартные отклонения в виде стандартной, комбинированной или расширенной неопределенности. Неопределенность по типу *B* оценивают нестатистическими методами, а на основании определенных предположений о зависимости функции распределения измеряемой величины [33]. В литературе нет обоснованных формул для расчета $U(\text{LOD})$. Тем не менее в соответствии с общепринятым подходом к оценке неопределенности [15, 17] значение $U(\text{LOD})$ логично выражать с использованием стандартных отклонений площадей пиков на уровне LOD основного вещества.

Для этого следует приготовить раствор основного (лекарственного) вещества с концентрацией, соответствующей LOD. Хроматографировать этот раствор такое же количество раз, как хроматографируют испытуемый раствор для определения примесей при аттестации СО. Вычислить неопределенность предела определения органических примесей по формуле:

$$U(\text{LOD}) = 100 \cdot \sqrt{\left(\frac{SD_{\text{LOD}} \cdot 1}{S_{\text{TestSol}}}\right)^2 + \sum \left(\frac{SD_{\text{LOD}} \cdot f_i}{S_{\text{TestSol}}}\right)^2}, \quad (24)$$

где SD_{LOD} — стандартное отклонение площади пика основного вещества на хроматограммах раствора с концентрацией, соответствующей LOD; S_{TestSol} — среднее значение площади пика основного вещества на хроматограммах испытуемого раствора для определения органических примесей или лучше — среднее значение площади пика основного вещества на хроматограммах раствора сравнения, умноженное на отношение концентрацией испытуемого раствора и раствора сравнения; f_i — поправочный коэффициент для идентифицированной примеси i ; 1 — поправочный коэффициент для основного вещества; 100 — множитель для пересчета в проценты. В формуле (24) под корнем первое слагаемое в скобках — относительная стандартная неопределенность значения содержания любой неидентифицированной примеси, второе слагаемое в скобках — относительная стандартная неопределенность значения содержания идентифицированной примеси i .

Примечание. В [48] предложена формально более простая формула для вычисления: $U(\text{LOD}) = \text{LOD}/C_{\text{det}}$, где LOD — концентрация раствора, соответствующая пределу обнаружения примеси; C_{det} — концентрация испытуемого раствора при определении примесей. Однако эта формула приведена без обоснования; кроме того, она неприменима для примесей, для которых требуется учет поправочных коэффициентов.

4.1.6. Оценка стандартной неопределенности однородности содержания основного вещества $U(\text{Hom})$ во флаконах с навесками СО

Для вычисления $U(\text{Hom})$ целесообразно использовать метод однофакторного ANOVA [30, 37, 41]. При этом в качестве групп можно рассматривать флаконы с навесками аттестуемой субстанции (количество флаконов p). Для вычисления $U(\text{Hom})$ сначала определяют стандартное отклонение содержания основного вещества: межгрупповое MS_{among} и внутригрупповое MS_{within} при числе анализов (проб) из каждого флакона j (см., например, [15], табл. 4, в ней “Дисперсионный анализ”; столбец MS ; строки — “между группами” (MS_{among}) и “внутри групп” (MS_{within})). Затем рассчитывают стандартную неопределенность однородности содержания основного вещества по формуле [24; 25]:

$$U(\text{Hom}) = \frac{\sqrt{(MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}})}}{j}. \quad (25)$$

Если окажется, что значение $U(\text{Hom})$ больше, чем $\sqrt{MS_{\text{within}}}$, то на этом завершают оценку $U(\text{Hom})$; в противном случае значение $U(\text{Hom})$ вычисляют по формуле [24]:

$$U(\text{Hom}) = \sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{j}} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{v_{\text{msw}}}}, \quad (26)$$

где v_{msw} — число степеней свободы при вычислении $\sqrt{MS_{\text{within}}}$, равное $p(j-1)$. Для примера, в [24] $p = 15$, $j = 3$. СО развешивали по флаконам по 50 мг, случайным образом отбирали 15 флаконов, и из каждого флакона анализировали по 3 пробы, в каждой из проб определяли содержание основного вещества в % прямым методом (титрованием).

4.1.7. Оценка стандартной неопределенности стабильности $U(\text{Stab})$ аттестованного СО

Проводят исследование стабильности образцов аттестуемой серии субстанции при условиях долгосрочного хранения по ICH [49]. Анализируют пробы, как минимум, в 5 точках, поскольку для надежной оценки коэффициентов линейной регрессионной зависимости требуется не менее 5 точек данных [28, с. 190]. Например, в [24, 25] это точки 0, 1, 2, 4, 6 и 12 мес естественного хранения.

Вычисляют линейную регрессионную зависимость содержания основного вещества X (%) в аттестуемой субстанции от продолжительности t ее хранения:

$$X = bt + a. \quad (27)$$

Определяют стандартное отклонение коэффициента наклона регрессионной прямой — SD_b . Затем рассчитывают неопределенность стабильности $U_{(Stab)}$ по формуле [15, 24, 25]:

$$U_{(Stab)} = SD_b \cdot t. \quad (28)$$

4.2. Оценка U_{Att} — неопределенности содержания основного вещества в СО при аттестации СО методом баланса масс в соответствии с формулой (2)

При использовании формулы (2) для аттестации СО методом баланса масс применяется иная формула для оценки расширенной неопределенности и вместо $U(X_{RelSub})$ вычисляют неопределенность значения P_0 : $U(P_1)$ [24]. Все другие необходимые формулы рассмотрены выше.

5. Об оценке неопределенности значения содержания основного вещества в СО — $U(X_{Att})$ по результатам межлабораторных исследований

В публикации [43] представлен подход для оценки неопределенности результатов межлабораторных анализов образцов через расширенную неопределенность; приведен пример для межлабораторных анализов образца феноксиметилпенициллина (в 9 лабораториях определяли содержание основного вещества, воды и примесей). Важно отметить, что этот подход теоретически обоснован и может быть использован для аттестации СО с привлечением межлабораторных исследований.

6. О выборе критерия Стьюдента — одностороннего или двухстороннего ($P = 95\%$) при оценке неопределенности аттестованного значения СО

На Украине при оценке неопределенностей результатов анализов, в том числе результатов аттестации СО, рекомендуется использовать односторонний критерий Стьюдента для 95 % доверительной вероятности ($P = 95\%$) [11, с. 1066]. При этом ссылаются на соответствие Европейской фармакопее [1]. Однако это соответствие не прямое, а лишь косвенное, формальное. В Европейской фармакопее в разделе 2.2.46 для определения содержания основного вещества в субстанциях (Assay) приводится формула для расчета максимально допустимого относительного стандартного отклонения RSD_{max} в зависимости от количества инъекций, и в ней используется двусторонний критерий Стьюдента для $P = 90\%$, численно равный одностороннему критерию для $P = 95\%$ [1].

Более того, в РМГ 93-2009 ГСИ “Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов” при определении коэффициента охвата в формуле для расширенной неопределенности аттестованных значений СО используют таблицу для двусторонних, а не для односторонних значений критериев Стьюдента ([15], с. 24 — формула (9.3); с. 27 — табл. Б2) для такой же доверительной вероятности — 95 %. На наш взгляд это более логично, поскольку учитывается возможность нахождения искомой величины не только ниже, но и выше среднего экспериментального значения. Поскольку двусторонний критерий Стьюдента всегда больше, чем односторонний, его использование ведет к большей неопределенности при одинаковых значениях доверительной вероятности P и числе степеней свободы v . В результате может оказаться, что условие типа (3) выполняется для одностороннего и не выполняется для двустороннего критерия Стьюдента, но не наоборот. Поэтому, при аттестации СО предпочтительнее использовать двусторонний критерий Стьюдента.

Поскольку метод баланса масс является современным, наиболее точным методом аттестации субстанций как СО, рассмотренные выше материалы и рекомендации будут, несомненно, полезны всем сотрудникам, имеющим отношение к использованию СО при разработке и при контроле качества лекарственных препаратов и субстанций. Это прежде всего сотрудники исследовательских лабораторий и контрольно-аналитических лабораторий, включая лаборатории отделов контроля качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. *European Pharmacopoeia*, EP 8.5, Part 5.12 (2015).
2. Validation of analytical procedures, *Establishment (handling and characterization) of reference standards in the testing of medical products*, В. А. Н., Bonn (2009), pp. 149 – 154; *Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, В. В. Береговых (ред.). Литера, Москва (2008), сс. 97 – 106.
3. T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. van der Veen Heinz Schimmel, A. Lamberty, *Accred. Qual. Assur.*, **6**, 20 – 25 (2001). <http://cite-seerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.198.3356&rep=rep1&type=pdf>.
4. EEE / RM / 062rev3, *The Selection and Use of Reference Materials*, Eurochem Guide (2002); <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/EEE-RM-062rev3.pdf>.
5. EA-4 / 14 INF:2003, *The Selection and Use of Reference Materials*, Rev. 16, European Accreditation (2015).
6. W. Hauck., *Pharm. Res.*, **29**, 922 – 931 (2012).
7. В. А. Меркулов, Е. И. Саканян, В. И. Климов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(11), 54 – 56 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(11), 776 – 778 (2015).
8. *United States Pharmacopoeia*, USP38 – NF33 (2015).
9. Д. А. Леонтьев, *Фармаком*, № 1 / 2, 44 – 51 (2006).
10. Д. А. Леонтьев, *Фармаком*, № 1 / 2, 25 – 32 (2012).

11. Д. А. Леонтьев, *Фармацевтические стандартные образцы*, в кн.: *Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств*, В. П. Георгиевский (ред.), НТМТ, Т. 3, Харьков (2011), сс. 1064 – 1117.
12. Д. А. Леонтьев, А. И. Гризодуб, М. Г. Левин, Т. Н. Доценко, *Фармаком*, № 3, 1 – 13 (2002).
13. ГОСТ Р 8.694-2010 (рук-во ИСО 35:2006), *Стандартные образцы материалов (веществ). Общие статистические принципы определения метрологических характеристик*, Госстандарт России, Москва (2010).
14. РМГ 55-2003 ГСИ, *Стандартные образцы состава чистых органических веществ. Методы аттестации. Основные положения*, ИПК Изд-во стандартов, Москва (2003).
15. РМГ 93-2009 ГСИ, *Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов*, Статинформ, Москва (2011).
16. ISO Guide 34, *Standard Application Document for Reference Material Producers*, (2009).
17. Р 50.2.058-2007 ГСИ, *Оценивание неопределенностей аттестованных значений стандартных образцов*, Стандартиформ, Москва (2008).
18. Shu-Yu Liu, Chang-Qin Hu., *Analyt. Chimica Acta*, **602**(1), 114 – 121 (2007).
19. Ki Ma, H. Wang, M. Zhao, J. Xing, *Analyt. Chimica Acta*, **650**(2), 227 – 233 (2009).
20. Raquel Nogueira, Eliane Cristina Pires do Rego, Marcus Vinicius Barreto Sousa, et al., *Braz. J. Pharm. Sci.*, **47**(2), 339 – 350 (2011).
21. Raquel Nogueira, Werickson F. C. Rocha, Thais E. Silva, et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **23**(3), 435 – 444 (2012); http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532012000300009.
22. R. Nogueira, B. Garrido, R. Borges, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **48**(33), 502 – 513 (2013).
23. Seung-Hyun Kim, Joonhee Lee, Seonghee Ahn, et al., *Bul. Korean Chem. Soc.*, **34**(2), 532 – 538 (2013).
24. Ningbo Gong, Baoxi Zhang, Fan Hua, et al., *Steroids*, **92**, 25 – 31 (2014); http://ncps.imm.ac.cn/upload/files/20153/000904_12_%E9%BE%9A%E5%AE%81%E6%B3%A2.pdf.
25. Gong Ni, Wang Xi, Zhang Bi, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **89**, 106 – 110 (2014).
26. Fuhai Su, Xinhua Dai, Hogmei Li, *Pharm. Anal. Acta.*, **6**(7), 1 – 5 (2015).
27. Janaina M. Rodrigues, Eliane C. P. Rego, Evelyn F. Guimarães, et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **26**(5) (2015); On line version: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-505320150005000869.
28. К. Дерффель, *Статистика в аналитической химии*, Мир, Москва (1994).
29. *International Conference on Harmonization (ICH) Tripartite Guideline. ICH Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances*, Geneva (2006).
30. Н. А. Эпштейн, *Разработка и рег. лек. средств*, № 1, 106 – 117 (2016).
31. У. Уэндландт, *Термические методы анализа*, пер. с англ., В. А. Степанов и В. А. Берштейн (ред.), Мир, Москва (1978).
32. А. П. Арзамасцев, П. Л. Сенов, *Стандартные образцы лекарственных веществ*, Медицина, Москва (1978), сс. 56 – 69.
33. EURACHEM / CITAC Guide CG 4, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3-d ed., EURACHEM / CITAC Guide (2012).
34. Can Quan, Huanfang Yao, Caixia Hou, *Agricultural Sci.*, **4**(9B), 89 – 96 (2013).
35. Chris Burgess, *Pharm. Technol.*, **37**(9), 62 (2013); <http://www.pharmtech.com/basics-measurement-uncertainty-pharma-analysis?pageID=3>
36. K. Gates, N. Chang, I. Dilek, et al., *J. Analyt. Toxicol.*, **33**, 532 – 539 (2009).
37. A. M. H. van der Veen, J. Pauwels., *Accred Qual Assur.*, **5**, 464 – 469 (2000).
38. Raquel Nogueira, Eliane Cristina Pires do Rego, Marcus Vinicius, et al., *Braz. J. Pharm. Sci.*, **47**(2), 339 – 350 (2011).
39. П. Л. Кадис, *Зав. лаб.*, **74**, 61 – 67 (2008).
40. A. M. H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels., *Accred. Qual. Assur.*, **6**, 26 – 30 (2001).
41. A. M. H. van der Veen, T. P. J. Linsinger, A. Lamberty, J. Pauwels., *Accred. Qual. Assur.*, **5**, 257 – 263 (2000).
42. A. M. H. van der Veen, T. P. J. Linsinger, H. Schimmel, et al., *Accred. Qual. Assur.*, **6**, 290 – 294 (2001).
43. P. Dehouck, Y. Vander Heyden, J. Smeyers-Verbeke, et al., *Analyt. Chim. Acta*, **481**, 261 – 272 (2003); <http://files.instrument.com.cn/FilesCenter/20050830/20058301927811927.pdf>.
44. R. H. Obenauf, N. Kocherlakota, *SPEX CertiPrep, The Application Notebook* (2005), pp. 26 – 28; http://images.alfresco.advant.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/b1eb2e5e-6bc7-4de9-8334-432ee31ce19c/article-148461.pdf
45. S. R. Davies, M. Alamgir, B. K. H. Chan, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 7983 – 7993 (2015).
46. *Calculation of Measurement Uncertainty. An Example for Titration*, Mettler-Toledo AG (2014); http://us.mt.com/dam/LabDiv/lps/uncertainty/white_paper_measurement_of_uncertainty_in_titration.pdf.
47. Shinsuke Inagaki, Toshiaki Asakai, Masahiko Numata, et al., *Royal Soc. Chem.*, **00**, 1 – 3 (2012); <http://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/C3AY42314J>.
48. P. Konieczka, J. Namiesnik., *J. Chromatogr. A*, **1217**, 882 – 891 (2010).
49. *International Conference on Harmonization (ICH) Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q1A(R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products*, Geneva (2003).

Поступила 15.07.16

CERTIFICATION OF REFERENCE SAMPLES IN PHARMACY: MASS BALANCE METHOD

N. A. Epshtein

STADA PharmDevelopment R&D Corporation, NIZHPHARM Company, Moscow, 109029 Russia

Approaches to certification of substances as reference standards by the mass balance method and restrictions, which should be considered when using this method are considered. Formulas for the estimation of uncertainty of certified values are presented, including new formulas which are absent in literature for assessment (a) the uncertainty of the content of organic impurities obtained by the method of normalization of the areas (heights) of peaks with correction coefficients and (b) the uncertainty of a limit of detection of organic impurities. Recommendations for correct certification of reference standards by the mass balance method are provided.

Keywords: reference samples; certification; attestation; uncertainty; mass balance method; recommendations; pharmacy.