

Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования

А.В. Егорова¹, А.А. Федосенко², Г.В. Мальцев², В.П. Антонович^{1*}

¹Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Украина, 65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86

²ОДО «ИНТЕРХИМ», Украина, 65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86

*Адрес для переписки: Антонович Валерий Павлович, E-mail: antonovichvp@ukr.net

Поступила в редакцию 14 июля 2015 г., после исправлений – 19 октября 2015 г.

При производстве лекарств важнейшим требованием надлежащей производственной практики (GMP) является очистка оборудования, которая проводится для предотвращения его перекрестной контаминации при переходе от одного лекарственного препарата к другому. В результате исследования разработан теоретический подход для определения основной метрологической характеристики аналитической методики контроля качества очистки оборудования – максимально допустимой неопределенности результата измерения, основанный на требовании к ПКО, в соответствии с принципом незначимости, и валидационных критериев проверки линейности, а именно требования к коэффициенту корреляции, угловому коэффициенту и свободному члену линейной регрессии. Возможности данного подхода рассмотрены на примере способа определения остаточных количеств деквалиния хлорида на поверхностях фармацевтического оборудования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанная методика валидирована по следующим показателям: специфичность, линейность градуировочного графика, точность, предел количественной линейности градуировочного графика в диапазоне концентраций от 0.05 мкг/мл до 0.75 мкг/мл, а чувствительность методики позволяет количественно определять до 0.08 мкг/мл аналита, что составляет 16 % от предельно допустимого содержания остаточного количества деквалиния хлорида на оборудовании после его очистки. Показано, что данная методика позволяет получать правильные результаты, что характеризуется статистически незначимой систематической погрешностью.

Ключевые слова: валидация, очистка фармацевтического оборудования, деквалиния хлорид, ВЭЖХ.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 4, pp. 387- 395
DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.002

Validation of methods for quality control of cleaning the pharmaceutical equipment

A.V. Yegorova¹, G.A. Fedosenko², G.V. Maltsev², V.P. Antonovich^{1*}

¹A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute of the National Academy of Sciences, Ukraine, 86, Liustdorfskaia doroga, Odessa, 65080, Ukraine

²"INTERCHEM SLC", 86, Liustdorfskaia doroga, Odessa, 65080, Ukraine

*Corresponding author: Valery P. Antonovich, E-mail: antonovichvp@ukr.net

Submitted 14 July 2015, received in revised form 19 October 2015

During the production of drugs, the essential requirement of good manufacturing practice (GMP) is cleaning of the equipment, which is performed to prevent the cross contamination when switching from one drug to another. The current study developed a theoretical approach to determine the basic metrological characteristics of analytical quality control methods for cleaning the equipment - the maximum permissible uncertainty of the measurement result based on the demand for LOQ in accordance with the principle of insignificance, and the validation of tests for linearity, namely the requirements for the correlation coefficient, slope and free terms of linear regression. The approach to establish acceptability criteria in the creation and validation of the analytical quality control methods for the cleaning of the production pharmaceutical equipment is considered, and is based on the use of the HPLC method for the determination of dequalinium chloride residual quantities on the pharmaceutical equipment surfaces. The developed method was validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, limit of quantification. It was found that the proposed

method is characterized by the proper linearity within the concentration range of 0.05 µg/ml - 0.75 µg/ml, and that the method's sensitivity allows quantifying 0.08 mg/mL of the analyte, which is 16 % of the maximum allowable amount of dequalinium chloride residual after the cleaning of the equipment surfaces. It was shown that the proposed method allows obtaining correct results and is characterized by statistically insignificant errors.

Keywords: validation, cleaning pharmaceutical equipment, dequalinium chloride, HPLC.

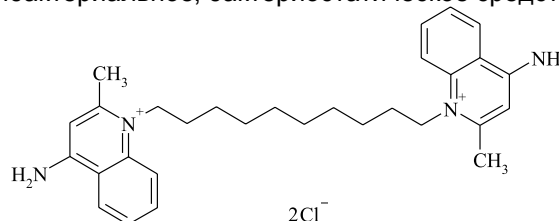
Введение

При производстве лекарств важнейшим требованием надлежающей производственной практики (GMP) является очистка оборудования, которая проводится для предотвращения его перекрестной контаминации при переходе от одного лекарственного препарата (ЛП) к другому. Валидация аналитической методики контроля остаточных количеств препарата на оборудовании после процесса очистки, так же как и валидация любой другой методики анализа, основывается на установлении её основной метрологической характеристики – максимально допустимой неопределенности результата измерения $max(\Delta_x)$. При валидации методик контроля качества ЛП максимально допустимая неопределенность результатов измерения устанавливается на основании нормативного допуска содержания активного фармацевтического ингредиента (АФИ) в препарате [1, 2]. Величина $max(\Delta_x)$ служит основой расчета критериев приемлемости, прежде всего линейности градуировки. При валидации методик контроля остаточных количеств ЛП после очистки фармацевтического оборудования такой подход неприемлем, поскольку в каждом конкретном случае необходимо предварительно устанавливать единственный норматив – это некоторое критическое значение остатков препарата F_{crit} на единице площади поверхности оборудования (чаще всего это – максимально допустимое содержание остатков предыдущего препарата, находящееся на 100 см² поверхности фармацевтического оборудования). Контроль качества очистки оборудования сводится к тому, чтобы обнаружить и количественно определить массу препарата на определенной единице поверхности оборудования. Условием качественной очистки является требование того, чтобы найденное с помощью данной методики количество препарата не превышало значение F_{crit} , которое зависит от многих параметров (площади поверхности оборудования, терапевтической суточной дозы предыдущего препарата, наименьшего размера серии последующего препарата и т.п.) и очень сильно варьируется от препарата к препарату.

Для определения остаточных количеств АФИ в фармацевтической промышленности необходимы методы, обладающие селективностью по отношению к аналиту и примесям – продуктам деградации, возникающим в технологическом процессе и при отмывке, а также высокой чувствительностью. К таким методам, как правило, относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [3-5], люминесценция [6, 7] и УФ-спектроскопия [8]. Возможен анализ проб по интегральным показателям, например, определение общего органическо-

го углерода, которое позволяет обнаруживать органические загрязнения в исключительно малых концентрациях (на уровне ppt) [9].

Деквалиния хлорид (ДХ) – 1,1'-(декан-1,10-ди-ил)бис(4-амино-2-метилхинолиний) дихлорид, антибактериальное, бактериостатическое средство:



ДХ обладает противовоспалительным и гемостатическим действием, эффективен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, грибов, вирусов.

Для определения ДХ в фармацевтических препаратах и биологических образцах используют спектрофотометрию [10, 11] и ВЭЖХ [12-15]. Некоторые из известных методик обладают высокой чувствительностью, достаточной для определения следовых количеств, однако они не были использованы для определения остаточных количеств ДХ при контроле очистки фармацевтического оборудования.

Цель данной статьи – разработка подхода к определению максимально допустимой неопределенности результатов измерений и установление критериев приемлемости при валидации методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования, возможности которого рассмотрены на примере методики ВЭЖХ определения остаточных количеств деквалиния хлорида.

Экспериментальная часть

Реагенты. Для приготовления подвижных фаз, растворов сравнения исследуемого АФИ и смывов применяли метанол (MERCK), воду для хроматографии и бидистиллированную. Раствор для пробоподготовки: 700 мл метанола смешивают с 300 мл воды, перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. В качестве стандартного образца использовали фармацевтическую субстанцию ДХ, соответствующую требованиям Европейской фармакопеи [16].

Исходный раствор образца ДХ готовили следующим образом: 100.0 мг стандартного образца ДХ помещали в мерную колбу вместимостью 200.0 мл, добавляли 150 мл раствора для пробоподготовки, перемешивали на магнитной мешалке при нагревании (40 °С), охлаждали и доводили объем до метки тем же растворителем. 0.5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимо-

стью 50.0 мл, доводили объём до метки раствором для пробоподготовки и перемешивали (5.0 мкг/мл).

Раствор для проверки пригодности: в мерную колбу вместимостью 10.0 мл помещали 0.1 мл исходного раствора ДХ, доводили объём до метки раствором для пробоподготовки и перемешивали (0.05 мкг/мл).

Смывы с поверхности осуществляли хлопковыми аппликаторами (свабами) Alpha® Sampling Swab марки TX 715, смоченными 96 % этиловым спиртом.

Аппаратура. Анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 2D LC System с УФ-детектором (Германия) в градиентном режиме на колонке из нержавеющей стали размером 0.25 м × 4.6 мм, заполненной сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ с размером частиц 5 мкм (октадецилсилильный силикагель).

В работе использовали весы лабораторные электронные AX 124 фирмы SARTORIUS (Германия), магнитную мешалку ARE (VELPScientifica, Италия) и pH-метр - милливольтметр серии Seven Easy фирмы Mettler Toledo (Китай).

Результаты и их обсуждение

Максимально допустимая неопределенность аналитической методики

Опорным пунктом для выработки критериев должно стать требование к пределу количественного определения методики ($x_{\text{ПКО}}$), которое формулируется следующим образом: предел количественного определения является достаточным для анализа по данной методике и незначимо влияет на принятие решения о качестве, если он в свою очередь является незначимым по сравнению с предельным содержанием аналита (x_{crit}). В соответствии с принципом незначимости [17] для этого достаточно, чтобы $\max(x_{\text{ПКО}})$ не превышал 32 % x_{crit} :

$$\max(x_{\text{ПКО}}) = 0.32 \cdot x_{\text{crit}} \quad (1)$$

В настоящей работе мы воспользовались подходом к расчету ПКО по градуировочному графику зависимости $y = a + bx$ аналитического сигнала от количества аналита, где пределом количественного определения называют величину, представляющую собой десятикратное отношение выборочного стандартного отклонения оценки свободного члена линейной аппроксимации s_a к её угловому коэффициенту b [18]:

$$x_{\text{ПКО}} = \frac{10 \cdot s_a}{b}, \text{ где } s_a = \frac{s_e}{\sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^{-2}}{(n-1) \cdot s_x^2}} \quad (2)$$

или

$$x_{\text{ПКО}} = \frac{10 \cdot s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^{-2}}{(n-1) \cdot s_x^2}} \quad (3)$$

где n – количество точек градуировочного графика; s_e – остаточное выборочное стандартное отклонение экспериментальных точек от линии регрессии градуировочного графика, рассчитанное по мето-

ду наименьших квадратов (МНК); s_x – стандартное отклонение диапазона содержания аналита.

Содержание аналита x_k даст по градуировочному графику предсказание для значения аналитического сигнала y_k , определяемого по формуле [19]:

$$y_k = a + b \cdot x_k \pm \Delta_y = a + b \cdot x_k \pm t(P, f) \frac{s_e}{\sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}} \quad (4)$$

где $t(P, f)$ – двусторонний квантиль распределения Стьюдента для доверительной вероятности P и степеней свободы $f = n - 2$.

Тогда аналитический сигнал y_k даст по градуировочному графику предсказание для содержания аналита x_k с доверительным интервалом:

$$\Delta_x = \frac{\Delta_y}{b} = t(P, f) \frac{s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}} \quad (5)$$

Комбинация выражений (3) и (5) дает зависимость неопределенности содержания аналита (Δ_x) от ПКО:

$$\Delta_x = t(P, f) \cdot \frac{x_{\text{ПКО}}}{10} \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{\text{crit}} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^{-2}}} \quad (6)$$

Из формул (1) и (6) получим искомое выражение для относительной максимально допустимой неопределенности методики:

$$\max(\Delta_x) \% = 3.2 \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{\text{crit}} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^{-2}}} \quad (7)$$

Из полученного выражения следует, что $\max(\Delta_x) \%$ будет определяться только лишь количеством точек для построения градуировочной зависимости, стандартным отклонением для диапазона содержания аналита s_x , а также абсолютной разностью между предельным содержанием (x_{crit}) и центром диапазона содержания аналита.

Критерии приемлемости линейной зависимости

Стандартизация критериев приемлемости для параметров линейной зависимости требует нормализации координат. Иначе говоря, экспериментальные значения координат градуировочного графика необходимо перенормировать таким образом, чтобы зависимость сигнала от концентрации не зависела от природы аналита и масштабных характеристик детектора. Т.е. новыми координатами для построения градуировочного графика должны стать значения, рассчитанные по формулам:

$$X_i = \frac{x_i}{x_{\text{crit}}} \cdot 100\% \text{ и } Y_i = \frac{y_i}{y_{\text{crit}}} \cdot 100\%$$

Расчет критического значения коэффициента корреляции

Коэффициент линейной корреляции r между двумя наборами данных X и Y определяется формулой [20]:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{(n-1) \cdot S_x \cdot S_y} = b \cdot \frac{S_x}{S_y} \leq 1 \quad (8)$$

где b – оценка параметра углового коэффициента, определенная МНК; S_x, S_y – стандартные отклонения, рассчитанные для нормализованных координат.

В случае линейной регрессионной модели $Y = a + bX$ квадрат коэффициента корреляции тождественно равен мере определенности или коэффициенту детерминации (R^2) [21]:

$$r^2 = R^2 = 1 - \frac{(n-2) \cdot S_e^2}{(n-1) \cdot S_y^2} \quad (9)$$

Прежде всего установим верхнюю границу для остаточной дисперсии, т. е. её максимально допустимое значение $\max(S_e^2)$. Так как доверительный интервал для предсказания содержания аналита определяется формулой (5), то для него в точке $X_k = X_{crit} = 100\%$ выполняется условие

$$\Delta_x \leq \max(\Delta_x), \text{ т.е. } t(P, f) \cdot \frac{S_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (100 - \bar{X})^2}{(n-1) \cdot S_x^2}} \leq \max(\Delta_x) \quad (10)$$

из которого и получаем выражение для $\max(S_e^2)$:

$$S_e^2 \leq \max(S_e^2) = \left(\frac{b \cdot S_x \cdot \max(\Delta_x)}{t(P, f)} \right)^2 \cdot \frac{n \cdot (n-1)}{(n-1) \cdot S_x^2 + n \cdot (100 - \bar{X})^2} \quad (11)$$

Установим теперь нижнюю границу для выборочной дисперсии аналитического сигнала S_y^2 . Из определения коэффициента корреляции (8) следует выражение для нижней границы S_y^2 :

$$S_y^2 \geq b^2 \cdot S_x^2 \quad (12)$$

Комбинируя выражения (9), (11) и (12), получим условие для минимально допустимого значения коэффициента корреляции:

$$r \geq r_{min} =$$

$$\sqrt{1 - \frac{n \cdot (n-2) \cdot \max(\Delta_x)^2}{t^2(P, f) \cdot \left((n-1) \cdot S_x^2 + n \cdot (100 - \bar{X})^2 \right)}} \quad (13)$$

Требование к угловому коэффициенту

Угловой коэффициент линейной регрессии представляет собой, по сути, фактор отклика детектора. Для нормализованных координат его генеральное (теоретическое) значение равно единице. Отклонение от единицы его оценки b , полученной из данных выборки по МНК, характеризует мультипликативную составляющую систематической погрешности измерения [22]. Поскольку величина $\frac{\beta - b}{S_b}$ следует распределению Стьюдента с $(n-2)$ степенями свободы, то условие статистической незначимости отклонения углового коэффициента от единицы будет иметь вид:

$$\frac{|1 - b|}{S_b} \leq t(P, f) \text{ или} \quad (14)$$

$$1 - S_b \cdot t(P, f) \leq b \leq 1 + S_b \cdot t(P, f),$$

где S_b – стандартное отклонение углового коэффициента, рассчитанное из графика градуировочной зависимости в нормализованных координатах.

Требование к свободному члену уравнения

Свободный член a уравнения линейной регрессии представляет собой аддитивную составляющую систематической погрешности [22]. Условие статистической незначимости отклонения оценки свободного члена от нуля будет выполняться, если его значение не превзойдет своего доверительно-го интервала, т. е.

$$\frac{|a|}{S_a} \leq t(P, f) \text{ или} \quad (15)$$

$$-S_a \cdot t(P, f) \leq a \leq +S_a \cdot t(P, f),$$

где S_a – стандартное отклонение свободного члена, рассчитанное из графика градуировочной зависимости в нормализованных координатах. В работе [17] кроме статистической незначимости используется понятие практической незначимости. Условие для практической незначимости свободного члена имеет вид:

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \max(\Delta_x)}{1 - X_{min}/100} \quad (16)$$

Невыполнение условия (15) означает, что с вероятностью P есть основания считать отличной от нуля аддитивную составляющую систематической погрешности результата измерения аналитического сигнала. Условие (16) означает, что наличие такой погрешности незначимо влияет на принятие решения о результате измерения для данного диапазона концентраций.

Критерии для валидации методики определения остаточных количеств АФИ деквалиния хлорида после очистки фармооборудования

Применение изложенных выше теоретических подходов рассмотрим на примере производства ЛП, одна дозированная единица которого содержит деквалиния хлорида 0.25 мг, на опытно-промышленном оборудовании фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» (Украина).

Расчет максимально допустимого содержания остатков предыдущего препарата (деквалиния хлорида)

При расчете предела содержания АФИ на оборудовании после производства и очистки использовали подход, который основан на принципе «наихудшего случая» по активности и на допущении переноса определенной дозы первого АФИ в последующее АФИ с учетом суточных доз [23]. Поэтому для фактического расчёта x_{crit} для ДХ был выбран последующий препарат с наибольшей максимальной суточной дозой, производимый на производственном участке ОДО «ИНТЕРХИМ» – а именно МЕБИКАР® IC, таблетки по 0.5 г АФИ, максимальное число дозированных форм в суточной дозе которого составляет $N_2 = 20$ шт, а наименьшая загрузка таблетмассы серии – $N_1 = 0.150$ кг, номинальная масса одной таблетки $m_0 = 0.550$ г.

Предельно допустимая масса предшествующего продукта ДХ в максимальной суточной дозе последующего, D (мг) составит:

$$D = \frac{TD \cdot SF}{100}$$

где TD – терапевтическая доза предшествующего продукта, мг; SF – фактор безопасности предшествующего АФИ: допустимая доля предшествующего продукта от его терапевтической дозы в максимальной суточной дозе последующего, %.

Теоретическое предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта на всем оборудовании после очистки, E_T (мг): $E_T = \frac{D \cdot N_1}{m_0 \cdot N_2} \cdot 10^3$.

С учетом того, что на всей площади S_2 , контактируемой с продуктом, должно находиться E_T мг предшествующего продукта, в пробе, взятой с участка оборудования с поверхностью пробоотбора площадью S_1 , должно находиться теоретическое предельно допустимое значение массы остатков предыдущего продукта в пробе (в смыве с площади S_1) – F_{crit} (мкг/сваб): $F_{crit} = \frac{E_T \cdot S_1}{S_2} \cdot 10^3$.

Терапевтическая доза предыдущего препарата, содержащего ДХ, составляет 6 таблеток согласно инструкции по применению. Содержание АФИ ДХ в 1 таблетке – 0.25 мг и, таким образом, терапевтическая доза ДХ будет равна 1.5 мг. Общая площадь рабочего оборудования, контактируемого с продуктом на участке, составляет $S_2 = 8165$ см². При факторе безопасности $SF = 1$ %, предельно допустимое значение массы остатков деквалиния хлорида в смыве с площади $S_1 = 100$ см² составит $F_{crit} = 2.5$ мкг/сваб. Поскольку с одного сваба аналит извлекается растворителем объемом 5.0 мл, то предельно допустимая концентрация содержания аналита составит $x_{crit} = 0.5$ мкг/мл.

Построение градуировочного графика

В мерные колбы вместимостью 10.0 мл помещают по 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 и 1.5 мл полученного исходного раствора стандартного образца ДХ и доводят до метки раствором для пробоподготовки, получая растворы с содержанием ДХ 0.05, 0.10, 0.15, 0.30, 0.35, 0.40, 0.50 и 0.75 мкг/мл, соответственно.

Хроматографируют полученные растворы при условиях, указанных в разделе «Методика определения». По полученным результатам строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс значения концентрации деквалиния хлорида, в микрограммах на миллилитр, а по оси ординат – значения площадей пиков (рис. 1).

Из данного графика рассчитывали ПКО по формуле (2). Рассчитанный таким способом ПКО ДХ составил 0.08 мкг/мл. Это количество составляет 16 % от $x_{crit} = 0.5$ мкг/мл и не превосходит его максимального допуска 32 % от предельно допустимого содержания аналита, в соответствии с принципом незначимости (1).

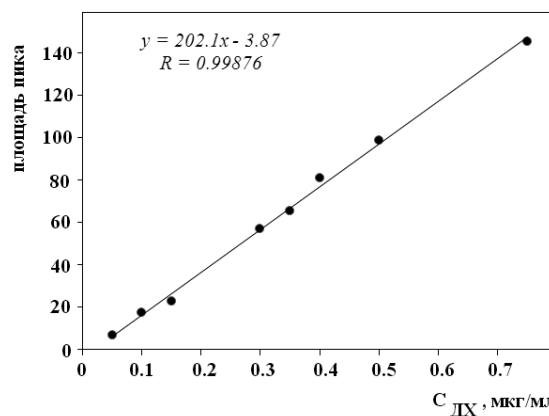


Рис. 1. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации деквалиния хлорида

Расчет максимальной неопределенности методики определения ДХ

Среднее значение диапазона концентраций ДХ – $\bar{x} = 0.325$ мкг/мл; стандартное отклонение – $s_x = 0.231$ мкг/мл, предельно допустимая концентрация содержания ДХ – $x_{crit} = 0.5$ мкг/мл. Значение критерия Стьюдента для $P = 95\%$ и $f = n - 2 = 6$ равно $t(95, 6) = 2.4469$. Подставляя эти значения в формулу (7), для максимальной неопределенности методики получаем:

$$\max(\Delta_x)\% = 3.2 \cdot 2.4469 \cdot \sqrt{\frac{7 \cdot 0.231^2 + 8 \cdot 0.175^2}{7 \cdot 0.231^2 + 8 \cdot 0.325^2}} = 5.6\%.$$

Таким образом, для данного диапазона концентраций и количества точек для построения градуировочного графика максимальная относительная неопределенность методики определения ДХ при контроле очистки оборудования составляет 5.6%.

Критерии приемлемости линейной зависимости

Сводные результаты по расчету критериев приемлемости линейной зависимости для методики определения остаточных количеств деквалиния хлорида в смывах после очистки оборудования приведены в табл. 1. Как видно из приведенных в таблице данных, все параметры линейной зависимости площадей пиков ДХ от концентраций, постро-

енной в относительных координатах, выдерживают установленные требования в условиях настоящей методики. Таким образом, данная методика позволяет вести количественное определение остаточных количеств АФИ деквалиния хлорида до 16 % от предельно допустимого значения.

На основании этого можно сделать вывод, что данная методика характеризуется приемлемой линейностью градуировочного графика для заданного диапазона концентрации аналита при заданной максимальной неопределенности $\max(\Delta_x) = 5.6\%$.

Определение степени извлечения АФИ деквалиния хлорида

В модельных опытах в ходе валидации метода делали смывы свабом, смоченным 96 % этиловым спиртом, с поверхности (100 см²), на которую наносили 2.5 мкг АФИ ДХ, далее проводили извлечение 5.0 мл раствора для пробоподготовки (0.5 мкг/мл). Было установлено, что степень извлечения деквалиния хлорида в конечный раствор составляет около 75 % (табл. 2).

Методика определения

Исследуемый раствор. Сваб со смывом за загрязнения оборудования помещают в лабораторный стакан, добавляют 5.0 мл раствора для пробоподготовки и проводят десорбцию в течение 10 минут. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр (0.45 мкм; Minisart SPR-25, PTFE, «Sartorius», Германия).

Таблица 1

Критерии приемлемости параметров градуировочного графика для определения ДХ в нормализованных координатах

Параметр линейной зависимости	Критическое значение	Фактическое значение	Результат
Кэффициент линейной корреляции r	≥ 0.99495	0.99876	соответствует
Угловой коэффициент регрессии b	от 0.94891 до 1.05108	1.02381	соответствует
Свободный член регрессии a	от - 3.98989 до 3.98989	-3.92097	соответствует
Предел количественного определения, ПКО %	≤ 32	16	соответствует

Таблица 2

Степень извлечения деквалиния хлорида с поверхности фармацевтического оборудования

Номер смыва	1	2	3	4	5	Среднее значение	RSD, %
Степень извлечения деквалиния хлорида, %	74.5	80.1	74.5	79.2	68.6	75.6	6.3

Таблица 3

Программа градиента для определения ДХ методом ВЭЖХ

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0→5	100	0
5→5.1	100→70	0→30
5.1→10	70	30

Оптимизированные условия хроматографирования:

подвижная фаза А: 2.0 г натрия гексансульфоната помещают в мерный стакан вместимостью 2000 мл, растворяют в 300 мл воды, доводят до pH = 4.0 кислотой уксусной, добавляют 700 мл метанола; подвижная фаза В: метанол; скорость подвижной фазы: 2.0 мл/мин; температура колонки: 25°C; детектирование при длине волны 240 нм; объём инъекции 100 мкл. Определение проводят в градиентном режиме по следующей программе (табл. 3).

Проверка пригодности системы. Хроматографическую систему следует признать пригодной, если отношение сигнал/шум, рассчитанное для пика ДХ из хроматограммы раствора для проверки пригодности, составляет не менее 3 (при расчете не учитывают системные пики с временами удерживания до 2.4 минуты).

Обработка результатов. Концентрацию деквалиния хлорида С (мкг/мл) в исследуемом растворе определяют по градуировочному графику. Содержание деквалиния хлорида (X), в микрограммах на сваб, рассчитывают по формуле:

$$X = C \cdot 5 \cdot \frac{100}{k} \text{ (мкг/сваб)},$$

где С – концентрация деквалиния хлорида (мкг/мл), полученная по градуировочному графику; k – поправочный коэффициент (степень извлечения, k = 75 %).

На рис. 2-4 приведены хроматограммы контрольного опыта (чистый сваб), подвижной фазы и модельных растворов деквалиния хлорида для построения градуировочного графика.

Выводы

В результате исследования разработан теоретический подход для определения основной метрологической характеристики аналитической методики контроля качества очистки оборудования – максимально допустимой неопределенности результата измерения, основанный на требовании к ПКО, в соответствии с принципом незначимости, и валидационных критериев проверки линейности, а именно требования к коэффициенту корреляции, угловому коэффициенту и свободному члену линейной регрессии. На основании этого подхода установлены критические значения валидационных характеристик для методики определения АФИ деквалиния хлорида в смывах с поверхностей оборудования методом ВЭЖХ. Максимально допустимая неопределенность методики составила 5.6 %.

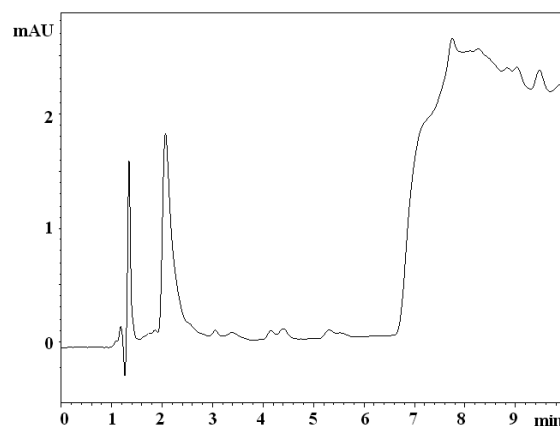


Рис. 2. Хроматограмма контрольного опыта (чистый сваб)

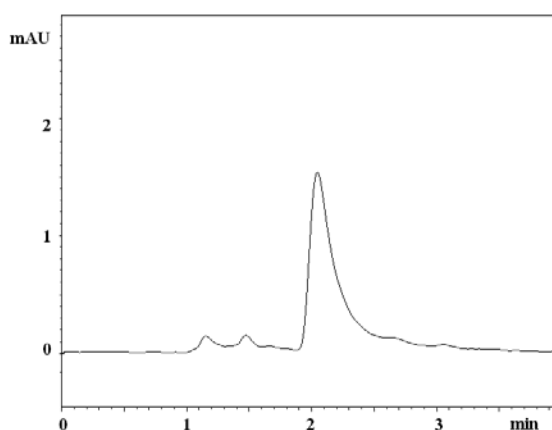


Рис. 3. Хроматограмма подвижной фазы

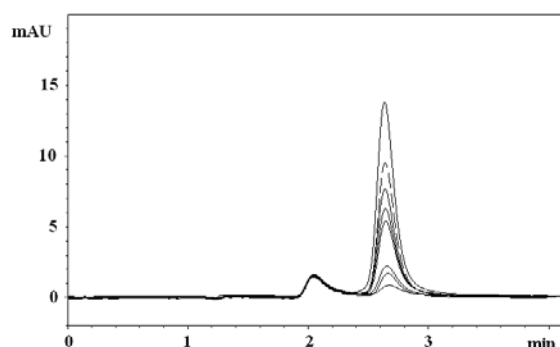


Рис. 4. Хроматограммы модельных растворов деквалиния хлорида для построения градуировочного графика (0.05 – 0.75 мкг/мл)

Установлено, что предложенная методика характеризуется удовлетворительной линейностью градуировочного графика в диапазоне концентраций от 0.05 мкг/мл до 0.75 мкг/мл, а чувствительность методики позволяет количественно определять до 0.08 мкг/мл аналита, что составляет 16 % от предельно допустимого содержания остаточного количества ДХ на оборудовании после его очистки. Показано, что данная методика позволяет получать правильные результаты, что характеризуется статистически незначимой систематической погрешностью.

Литература

- 1 Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". 1-е вид. Харків: PIPEГ. Доповнення 2. 2008. С. 97-100.
- 2 Асмолова Н.Н. Проведение очистки оборудования согласно требований надлежащей производственной практики (GMP) // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х томах на русском языке / Под ред. член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. Харьков: НТМТ, 2011. Т. 3. С. 1263-1297.
- 3 Shabir G.A. Equipment Cleaning Validation: Developing an HPLC Method to Determine Contamination Residues on Equipment Surfaces // *Am. Pharm. Rev.* 2008. V.11, № 4. P. 16-22.
- 4 Akl M.A., Ahmed M.A., Ramadan A. Validation of an HPLC–UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55, № 2. P. 247-252.
- 5 Schmidt A.H., Stanic M. UPLC-MS/MS in support of cleaning validation studies. Cephalosporin antibiotics production facility // *G.I.T. Laboratory J Europe.* 2012. V. 5-6. P. 28.
- 6 Rapid at-line pharmaceutical cleaning verification using a novel light induced fluorescence (LIF) sensor / D.N. Peles [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 72. P. 1-7.
- 7 Determination of cefmetazole residue at pharmaceutical manufacturing facilities by chemiluminescence flow injection analysis / N. Fakutsu [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006.V. 41, № 2. P. 599-602.
- 8 Кондратьева М.Л., Наприенко Е.Н., Шкуратова О.В. Разработка аналитических методик для валидации очистки оборудования, используемого в производстве лекарственных средств // *Сибирский медицинский журнал (г. Томск).* 2011. Т. 26, № 2, вып. 2. С. 94-97.
- 9 Glover C. Validation of the total organic carbon (TOC) swab sampling and test method // *J. Pharm Sci Technol.* 2006. V. 60, № 5. P. 284-290.
- 10 Leung C.P., Kwan S.Y. Spectrophotometric determination of dequalinium chloride in pharmaceutical preparations // *Analyst.* 1979. V. 104. P. 143-146.
- 11 Spectrophotometric methods for the determination of dequalinium chloride and clidinium bromide using ion-pair complex formation with acid dyes / T.Y. Mohamed [et al.] // *Egypt. J. Chem.* 2008. V. 51, № 1. P. 113-123.
- 12 Determination of the quaternary ammonium compounds dequalinium and cetylpyridinium chlorides in candy-based lozenges by high-performance liquid chromatography / R.B. Taylor [et al.] // *Analyst.* 1997. V. 122, № 9. P. 973-976.
- 13 Simultaneous quantitation of cationic disinfectants by high-performance liquid chromatography on a silicagel column using aqueous eluents / F.-A. Chen [et al.] // *J. Food Drug Anal.* 2001. V. 9, № 4. P. 191-198.
- 14 Gagliardi L., Cavazzutti G., Tonelli D. Determination of dequalinium chloride and related impurities in cosmetics and pharmaceuticals by reversed-phase HPLC // *Anal. Lett.* 1998.V.31, № 5. P. 829-839.
- 15 Determination of dequalinium chloride in dequalinium chloride buccal tablets by HPLC / W.-H. Fang [et al.] // *Anhui Med. Pharm. J.* 2011. № 7. P. 837-839.
- 16 European Pharmacopoeia. 7th edition. EP 7.0. Dequalinium chloride. 2008. (monograph 1413).
- 17 Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // *Аналитическая химия в создании, стандар-*

тизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х томах / Под ред. В.П. Георгиевского. Харьков: НТМТ, 2011. Т. 3. С. 934-1063.

- 18 Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". 1-е вид. Харків: PIPEГ. Доповнення 2. 2008. С. 90.
- 19 Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ: В 2-х кн. Кн. 1/ Пер. с англ. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Финансы и статистика, 1986. 366 с.
- 20 Смирнов Н.В., Дунин-Барковский И.В. Краткий курс математической статистики для технических приложений. М.: Гос. изд-во физико-математической литературы, 1959. 305 с.
- 21 Шторм Р. Теория вероятностей. Математическая статистика. Статистический контроль качества. М.: Мир, 1970. С. 207.
- 22 Новицкий П.В., Зограф И.А. Оценка погрешностей результатов измерений. – 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Энергоатомиздат, 1970, С. 15.
- 23 PIC/S document PI006-3. Recommendations on Validation Master Plan Installation and Operational Qualification, Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; 2007.

REFERENCES

1. Derzhavna Farmakopeia Ukraini [State Pharmacopoeia of Ukraine] / Derzhavne pidpriemstvo "Naukovo-ekspertnii farmakopeinii tsentr". 1-e vid. Kharkiv: RIREG. Dopovnennia 2. 2008, pp. 97-100 (in Ukraine).
2. Asmolova N.N. Provedenie ochildki oborudovaniia sglasno trebovanii nadlezhashchei proizvodstvennoi praktiki (GMP) [Carrying out the cleaning of equipment in accordance with the requirements of Good Manufacturing Practice (GMP)]. *Analytical Chemistry in the Development, Standardization and Quality Control of medications*, Edited by V.P. Georgiyevsky, Kharkov: HTMT, 2011, vol. 3, pp. 1263-1297 (in Russian).
3. Shabir G.A. Equipment Cleaning Validation: Developing an HPLC Method to Determine Contamination Residues on Equipment Surfaces. *Am. Pharm. Rev.* 2008, vol. 11, pp. 16-22.
4. Akl A.A., Ahmed M.A., Ramadan A. Validation of an HPLC–UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, vol. 55, pp. 247–252. doi: 10.1016/j.jpba.2011.01.020.
5. Schmidt A.H., Stanic M. UPLC-MS/MS in support of cleaning validation studies in an cephalosporin antibiotics production facility. *G.I.T. Laboratory J Europe.* 2012, vol. 5-6, pp. 28.
6. Peles D.N., Ely K.J., Crowder T.M., Ponstingl M. Rapid at-line pharmaceutical cleaning verification using a novel light induced fluorescence (LIF) sensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, vol. 72, pp.1-7. doi. org/10.1016/j.jpba.2012.09.018.
7. Fakutsu N., Sakamaki Y., Kawasaki T., Saito K., Nakazawa H. Determination of cefmetazole residue at pharmaceutical manufacturing facilities by chemiluminescence flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, vol. 41, no. 2, pp. 599-602. doi: 10.1016/j.jpba.2005.11.038.
8. Kondratyeva M.L., Naprienko E.N., Shkuratova O.V. [The development of analytical methods of validation of the medical drug equipment purification]. *Sibirskii meditsinskii zhurnal [Siberian Medical Journal]*. 2011, vol. 26, no.2-2, pp. 84–97 (in Russian).
9. Glover C. Validation of the total organic carbon (TOC) swab sampling and test method. *J. Pharm Sci Technol.* 2006, vol. 60, no.5, pp. 284-290.

10. Leung C.P., Kwan S.Y. Spectrophotometric determination of dequalinium chloride in pharmaceutical preparations. *Analyst*, 1979, vol. 104, pp.143-146. doi: 10.1039/AN9790400143.
11. Mohamed T.Y., Dossouki H.A., Moustafa M.M., Ghoname M.S. Spectrophotometric methods for the determination of dequalinium chloride and clidinium bromide using ion-pair complex formation with acid dyes. *Egypt. J. Chem*, 2008, vol. 51, no.1, pp. 113-123.
12. Taylor R.B., Toasaksiri S., Reid R.G., Wood D. Determination of the quaternary ammonium compounds dequalinium and cetylpyridinium chlorides in candy-based lozenges by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 1997, vol. 122, no. 9, pp.973-976. doi: 10.1039/A703893c.
13. Chen F.-A., Wu K.-S., Huang M.-C., Chen C.-Ya., Wu A.-B. Simultaneous quantitation of cationic disinfectants by high-performance liquid chromatography on a silicagel column using aqueous eluents. *J. Food Drug Anal*, 2001, vol. 9, no. 4, pp. 191-198.
14. Gagliardi L., Cavazzutti G., Tonelli D. Determination of dequalinium chloride and related impurities in cosmetics and pharmaceuticals by reversed-phase HPLC. *Anal. Lett.*, 1998, vol.31, no. 5, pp. 829-839.
15. Fang W.-H., Liu J., Shen J., Zhang L.-J. Determination of dequalinium chloride in dequalinium chloride buccal tablets by HPLC. *Anhui Med. Pharm. J.*, 2011, no.7, pp. 837-839.
16. European Pharmacopoeia. 7th edition. EP 7.0. Dequalinium chloride. 2008. (monograph 1413).
17. Grizodub A.I. Standartizovannyye prorsedury validatsii metodik kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv [Standardized procedures for the validation of methods of quality control of medicines]. *Analytical Chemistry in the Development, Standardization and Quality Control of Medications*, Edited by V.P. Georgiyevsky, Kharkov: HTMT, 2011, vol. 3, pp. 934-1063 (in Russian).
18. Derzhavna Farmakopeia Ukraini [State Pharmacopoeia of Ukraine] / Derzhavne pidpriemstvo "Naukovo-ekspertnij farmakopeinij tsentr". 1-e vid. Kharkiv: RIREG. Dopovnenia 2. 2008, p. 90.
19. Drejper N., Smit G. Prikladnoi regressiynni analiz [Applied Regression Analysis]. Moscow, Finansy i statistika, 1986, 366 p. (in Russian).
20. Smirnov N.V., Dunin-Barkovskij I.V. Kratkij kurs matematicheskoi statistiki dlia tekhnicheskikh prilozhenij [A short course of mathematical statistics for technical applications]. Moscow, Gos. izd-vo fiziko-matematicheskoi literatury, 1959, 305 p (in Russian).
21. Shtorm R. Teoriia verojatnostei. Matematicheskaja statistika. Statisticheskii kontrol' kachestva [Probability theory. Mathematical statistics. Statistical quality control] Moscow, Mir, 1970, p. 207 (in Russian).
22. Novickij P.V., Zograf I.A. Otsenka pogreshnostei rezul'tatov izmerenij [Evaluation of errors of measurement results]. 2-e izd., pererab. i dop. L.: Energoatomizdat, 1970, p. 15 (in Russian).
23. PIC/S document PI006-3. Recommendations on Validation Master Plan Installation and Operational Qualification, Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; 2007.