https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-168-173-suppl

Примеры оформления текста нормативной документации на лекарственные средства по разделу «Родственные примеси» (для метода ВЭЖХ)

Sample Template for the Product Specification File Section on Related Substances (HPLC)

1. Нормы

Диастереомер	не более 0,50%
Примесь А	не более 1,0%
Единичная неидентифицированная примесь	не более 0,10%
Сумма примесей	не более 2,0%

2. Метод

Пример оформления 1

Определение проводят методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»

Пример оформления 2

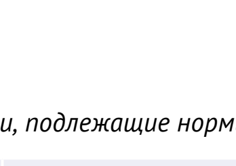
Определение проводят методом ионной хроматографии в соответствии с требованиями ФЕАЭС 2.1.2.36 «Хроматографические методы разделения»

Пример оформления 3

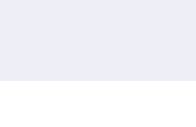
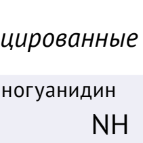
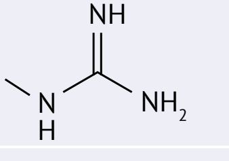
Определение проводят методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ФЕАЭС 2.1.2.36 «Хроматографические методы разделения»

3. Информация о примесях

Пример оформления 1 (в таблице указаны только идентифицированные примеси, подлежащие нормированию)

Примесь А метформина	1-цианогуанидин 

Пример оформления 2 (в таблице представлены идентифицированные примеси как подлежащие нормированию, так и включенные для информации)

Примесь А метформина	1-цианогуанидин 	Продукт деградации
1,1,1-триметилгидразиний		Примесь синтеза
γ-Аминомасляная кислота		Модельное вещество

4. Оборудование

Пример оформления 1

Хроматограф жидкостной с УФ-детектором

УЗ-ванна

Центрифуга

…

Пример оформления 2

1) Хроматографическая система с бинарным градиентным насосом со смешением при высоком давлении, WATERS ACQUITY UPLC, замена недопустима

2) Мешалка магнитная с нагревом. (Biosan MSH-300 или аналогичная)

3) УЗ-ванна

4) Центрифуга

…

Пример оформления 3

Хроматографическая система с бинарным градиентным насосом со смешением при высоком давлении, WATERS ACQUITY UPLC. Возможно использование оборудования другого производителя в аналогичной комплектации

Мешалка магнитная с нагревом. (Biosan MSH-300 или аналогичная)

УЗ-ванна

Центрифуга

…

5. Материалы

1) Хроматографическая колонка (LiChrospher 60 RP-select B, 4,0×125 мм, 5,0 мкм, Merck, кат. № 1.50981.0001 или аналогичная)

2) Хроматографическая предколонка (LiChrospher 60 RP-select B, 4,0×4,0 мм, 5,0 мкм, Merck, кат. № 1.50957.0001 или аналогичная)

3) Держатель для колонки и предколонки (Manu-CART® NT cartridge holder for LiChroCART® HPLC cartridges, Merck, кат. № 151486 или аналогичный)

4) Колонка Thermo Scientific™ ProPac™ WCX-10, 250×4 мм, 10 мкм (Thermo Fisher Scientific Inc., кат. № 054993). Замене не подлежит!

5) Фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм с мембраной из гидрофильного поливинилиденфторида (Millex-HV, Merck, кат. № SLHVR04NL или аналогичный)

6) Микроцентрифужные пробирки с низким связыванием белка вместимостью 2 мл (Eppendorf Protein LoBind® Tube, кат. № 022431102 или аналогичные)

7) Планшеты для концентрирования (Glyco Works HILIC μElution Plate, Waters, кат. № 186002780 или аналогичные)

…

6. Реактивы

Пример оформления 1 (по требованиям ЕАЭС)

1) *Натрия хлорид Р*

2) Трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich, кат. № 299537 или аналогичная)

3) РНКаза (CAS 9001-99-4, AppliChem, кат. № A3832, замена недопустима!)

4) *Ацетонитрил для хроматографии Р*

…

Пример оформления 2 (по национальной процедуре)

1) Натрия хлорид

2) Трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich, кат. № 299537 или аналогичная)

3) РНКаза (CAS 9001-99-4, AppliChem, кат. № A3832, замена недопустима!)

4) Ацетонитрил для хроматографии

…

7. Стандартные образцы

1) Гозерелин (ФСО.1.1.00176)

2) Ибандронат натрия (USP RS, кат № 1335417, или стандартный образец предприятия (ООО «Ромашка») или аналогичного качества)

3) Стандарт белков-маркеров молекулярной массы («Bio-Rad», кат. № 151-1901, замена недопустима)

4) Стандартный образец примесей транексамовой кислоты (BP CRS, кат. № 734 замена недопустима)

5) Эмтрицитабин (LGC Mikromol, кат. № MM1325.00 или аналогичный)

…

8. Приготовление растворов

Пример оформления 1 (по требованиям ЕАЭС)

Раствор хлороводородной кислоты
100 мл *воды для хроматографии Р* помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 56 мл *хлороводородной кислоты Р* и перемешивают. Доводят объем раствора *водой для хроматографии Р* до метки и перемешивают. Раствор годен в течение месяца при хранении в плотно закрытом сосуде при комнатной температуре.

Пример оформления 2 (по национальной процедуре)

Раствор хлористоводородной кислоты
100 мл воды для хроматографии помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 56 мл хлористоводородной кислоты и перемешивают. Доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают. Раствор годен в течение месяца при хранении в плотно закрытом сосуде при комнатной температуре.

Пример оформления 3 (по национальной процедуре)

1,0 М раствор аммония бикарбоната
В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 900 мл воды, прибавляют 79,00 г аммония бикарбоната и перемешивают до полного растворения навески. Доводят объем водой до метки и тщательно перемешивают. Раствор может храниться при температуре 2–8 °C не более 7 сут.

…

Приготовление подвижной фазы А
Около 3,4 г калия дигидрофосфата помещают в мерный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляют 800 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до значения 1,5±0,1 (потенциометрически). Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора до метки водой. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм (материал мембраны – регенерированная целлюлоза) и дегазируют любым удобным способом. Раствор годен в течение 48 ч при комнатной температуре.

…

Приготовление стандартного раствора
Около 20 мг (точная навеска) стандартного образца метформина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл воды при перемешивании, доводят объем до метки тем же растворителем и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки подвижной фазой А и перемешивают (0,008 мг/мл метформина гидрохлорида). Раствор используют свежеприготовленным.

…

Приготовление стандартного раствора
Около 30 мг (точная навеска) стандартного образца инозина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл воды при перемешивании, доводят объем до метки тем же растворителем и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки подвижной фазой А и перемешивают (0,048 мг/мл инозина). Раствор готовят в двух повторностях (1 и 2), используя отдельную навеску стандартного образца инозина для каждого из растворов. Раствор годен в течение 48 ч при комнатной температуре.

…

Приготовление стандартного раствора
Содержимое флакона со стандартным образцом октреотида растворяют в 1 мл воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл. Флакон промывают дважды 3 мл воды, собирая смывы в ту же мерную колбу. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор разбавляют с помощью дозатора переменного объема до 10 мкг/мл. Для этого в полимерную пробирку вносят 50 мкл полученного раствора, добавляют необходимое количество воды и перемешивают с помощью вортексной мешалки. При необходимости получения большего объема раствора объем аликвоты может быть увеличен. Необходимый объем воды в мкл рассчитывают по формуле:

$$V_{dil} = \frac{a_0}{V}\,\frac{V_{al}}{C_2} - V_{al},$$ где

a_0 — содержание октреотида основания во флаконе согласно сертификату, мг;
V — вместимость мерной колбы для первого разведения, мл (20 мл);
V_{al} — объем аликвоты раствора после первого разведения, мкл;
C_2 — целевая концентрация, мг/мл (0,01 мг/мл).

Раствор может храниться при температуре 2–8 °C не более 8 ч.

9. Условия хроматографирования

Пример оформления 1 (изократическое элюирование)

Колонка	PhenomenexKinetex C18, 150 × 4,6 мм, 2,6 мкм, 100 Å
Элюирование	Изократическое
Скорость потока	0,3 мл/мин
Подвижная фаза	0,02 М раствор KH_2PO_4 / Метанол в соотношении 85/15
Температура колонки	35 °C
Температура автосамплера	15 °C
Объем ввода	30 мкл
Раствор для промывки автосамплера	Вода / Ацетонитрил в соотношении 50/50
Время хроматографирования	Не менее трехкратного времени удерживания пика ситаглиптина
Детектор	Спектрофотометрический, 270 нм, длина оптического пути 10 мм, частота сбора данных 10 Гц

Пример оформления 2 (градиентное элюирование со стадией уравновешивания колонки к исходным условиям)

Колонка	ZORBAX Eclipse Plus C8, 250 × 4,6 мм, 5 мкм			
Предколонка	ZORBAX Eclipse Plus C8, 12,5 × 4,6 мм, 5 мкм			
Элюирование	Градиентное			
	Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %	F, мл/мин
	0	80	20	1,0
	15	80	20	1,0
	15,2	20	80	2,0
	20	20	80	2,0
	20,2	80	20	1,0
	25	80	20	1,0
Скорость потока	Согласно программе элюирования			
Подвижная фаза А	Вода			
Подвижная фаза Б	Ацетонитрил			
Температура колонки	45 °C			
Температура автосамплера	25 °C			
Объем ввода	10 мкл			
Раствор для промывки автосамплера	Вода / Ацетонитрил в соотношении 50/50			
Время хроматографирования	25 мин			
Время регистрации хроматограммы	15 мин			
Детектор	Спектрофотометрический (диодно-матричный для испытания по показателю «Подлинность») 250 нм Длина оптического пути 50 мм Частота дискретизации сигнала 2 Гц			
Диапазон регистрации УФ-спектра	От 220 до 300 нм, шаг 1 нм			

Пример оформления 3 (градиентное элюирование)

Элюирование	Градиентное		
	Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %
	0	95	5
	2	95	5
	25	20	80
	27	0	100
	30	0	100
	31	95	5
	40	95	5
Скорость потока	1,2 мл/мин		
Подвижная фаза А	0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде		
Подвижная фаза Б	0,1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле		
Температура колонки	45 °C		
Температура автосамплера	25 °C		
Объем ввода	10 мкл		
Раствор для промывки автосамплера	Подвижная фаза А / Подвижная фаза Б в соотношении 50/50		
Время хроматографирования	40 мин		
Время регистрации хроматограммы	25 мин (для раствора сравнения) 40 мин (для остальных растворов)		
Детектор	Спектрофотометрический 220 нм (для неидентифицированных примесей) 350 нм (для примеси С) Длина оптического пути 10 мм Частота дискретизации сигнала 10 Гц		
Диапазон регистрации УФ-спектра	От 220 до 300 нм, шаг 0,5 нм		

10. Идентификация пиков

Пример оформления 1

Время удерживания пика ситаглиптина около 18 мин, относительное время удерживания пика аддукта фумарата с ситаглиптином около 0,9 относительно пика ситаглиптина.

Пример оформления 2

Таблица идентификации пиков

Наименование	RRT*	RRF**	Примечание
Гидроксиритонавир	≈ 0,36	1,0	Продукт деградации
Этиловый аналог	≈ 0,64	–	Примесь синтеза. В результат не учитывают
Оксазолидиноновое производное	≈ 0,87	0,53	Продукт деградации (гидролиза)
Ритонавир	≈ 1,00	–	
Пик плацебо	≈ 1,25	–	В результат не учитывают

*RRT — относительное время удерживания;
**RRF — относительный фактор отклика.

11. Проведение испытания / Последовательность хроматографирования

Пример оформления 1

В хроматограф последовательно вводят бланк-раствор (1 инжекция), раствор для ПЧХС (1 инжекция), раствор сравнения (3 инжекции), раствор для ППХС (1 инжекция). Далее при выполнении требований пригодности системы инжектируют испытуемый раствор (2 инжекции).

Пример оформления 2

Рекомендуемая последовательность введения проб представлена в таблице ниже.

Раствор	Число инжекций	Назначение
Холостой раствор	1	Кондиционирование колонки
Раствор А	2	Оценка чувствительности системы
Раствор сравнения 1	5	Проверка пригодности системы / Расчет
Раствор сравнения 2	2	Проверка правильности приготовления раствора сравнения
Раствор Б	1	Проверка разделительной способности
Холостой раствор	1	Очистка колонки после введения раствора Б
Испытуемый раствор 1	1	Получение результата
Испытуемый раствор 2	1	Получение результата
…	…	…
Испытуемый раствор 6	1	Получение результата
Раствор сравнения 1	1	Проверка стабильности отклика

Последовательно может быть введено не более 6 испытуемых растворов. При необходимости инжекции большего количества через каждые 6 испытуемых растворов инжектируют раствор сравнения 1.

В конце каждой аналитической последовательности проводят очистку колонки при помощи трех введений по 1 мкл раствора хлороводородной кислоты 1 М по градиентной программе «Очистка».

Пример оформления 3

Рекомендуемая последовательность введения представлена в таблице ниже.

Раствор	Число инжекций	Объем инжекции, мкл	Время регистрации хроматограммы, мин	Назначение
Холостой раствор	1	50	40	Кондиционирование колонки
Раствор А	2	50	15	Оценка чувствительности системы
Стандартный раствор	1	2	15	Калибровка
	1	4	15	Калибровка
	5	6	15	Калибровка / проверка воспроизводимости
	1	8	15	Калибровка
	1	10	15	Калибровка
Раствор ППХС	1	50	40	Проверка разделительной способности
Холостой раствор	1	50	40	Учет системных пиков
Испытуемый раствор	3	50	40	Получение результата

12. Проверка пригодности хроматографической системы

1. На бланк-хроматограмме должен отсутствовать пик, совпадающий по времени удерживания с пиком ситаглиптина на хроматограмме раствора сравнения.
2. Отношение сигнал/шум для пика ситаглиптина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности должно быть не менее 10.
3. Относительное стандартное отклонение площади пика ситаглиптина, рассчитанное по пяти хроматограммам раствора сравнения, должно быть не более 5,0%.
4. Фактор асимметрии пика ситаглиптина на хроматограмме раствора сравнения должен быть от 0,8 до 1,2.
5. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности разрешение между пиком ситаглиптина и пиком аддукта ситаглиптина с фумаратом должно быть не менее 2,5.

13. Оценка результата

Пример оформления 1 (метод нормализации, факторы отклика равны 1)

Содержание единичной примеси (X_i), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i}{S} \cdot 100,$$ где

S_i — площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;
S — сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Пример оформления 2 (метод нормализации, факторы отклика разные)

Содержание единичной примеси (X_i), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot k_i}{S_0 + \sum S_i \cdot k_i} \cdot 100,$$ где

S_i — площадь пика любой единичной примеси флутамида на хроматограмме испытуемого раствора;
S_0 — площадь пика флутамида на хроматограмме испытуемого раствора;
k_i — поправочный коэффициент. k=1,5 для примеси А флутамида и k=1 во всех остальных случаях.

Пример оформления 3 (с раствором сравнения, приготовленным из стандартного образца основного вещества)

Содержание единичной примеси (X_i), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i}{S_0} \times \frac{a_0}{V_0} \times \frac{P}{100} \times \frac{G \cdot V_{ts}}{a \cdot L} \times k_i \times 100,$$ где

S_i — площадь пика любой единичной примеси флутамида на хроматограмме испытуемого раствора;
S_0 — площадь пика флутамида на хроматограмме раствора стандартного образца;
a_0 — навеска стандартного образца флутамида, взятая для приготовления раствора стандартного образца, мг;
a — навеска порошка таблеток, взятая для приготовления испытуемого раствора, мг;
V_0 — вместимость мерной колбы, использованной для приготовления раствора стандартного образца, мл (500 мл);
V_{ts} — вместимость мерной колбы, использованной для приготовления испытуемого раствора, мл (20 мл);
G — средняя масса таблетки, мг;
P — содержание флутамида в стандартном образце флутамида «как есть», %;
L — номинальное содержание флутамида в таблетке, мг (50 мг);
k_i — поправочный коэффициент, k=1,5 для примеси А флутамида и k=1 во всех остальных случаях.

Пример оформления 4 (с раствором сравнения, приготовленным из испытуемого раствора)

Содержание единичной примеси (X_i), в процентах, рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot k_i}{S_0} \cdot 0{,}2,$$ где

S_i — площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;
S_0 — площадь пика флутамида на хроматограмме раствора сравнения;
k_i — поправочный коэффициент, k=1,5 для примеси А флутамида и k=1 во всех остальных случаях.

Пример оформления 5

В результат не учитывает пики, присутствующие на хроматограмме плацебо, пик азопроизводного и примеси с содержанием менее 0,05%.

14. Рисунки хроматограмм

Пример оформления 1

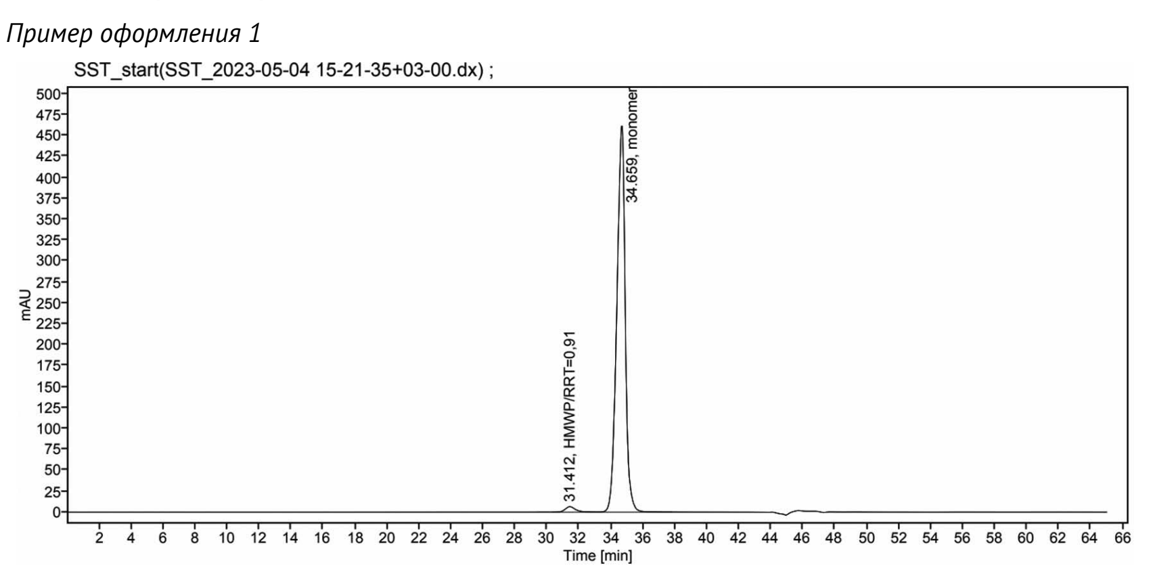


Рис. 1. Типичная хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы

Пример оформления 2

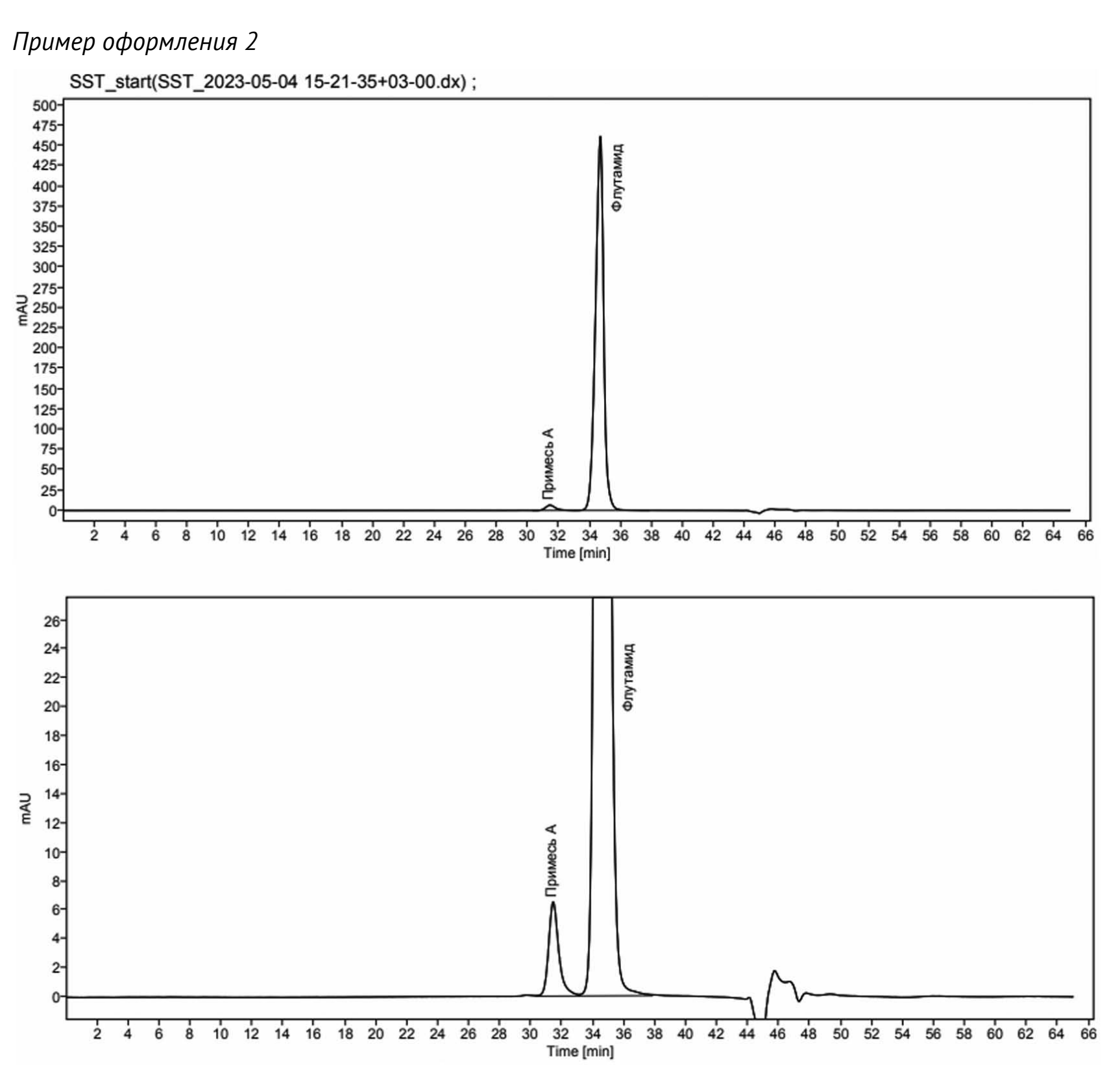


Рис. 2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора в полном масштабе и в масштабе единичной примеси

Пример оформления 3

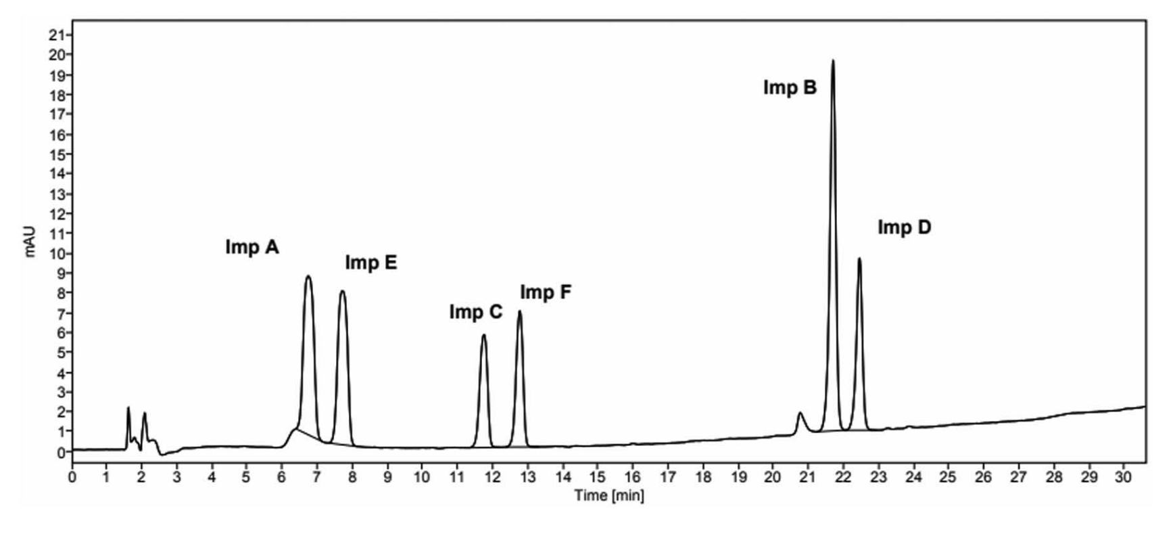


Рис. 3. Хроматограмма модельного раствора примесей вилдаглиптина