



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения



PerЛек

# Рекомендации к оценке родственных примесей методом ВЭЖХ в многокомпонентных лекарственных препаратах

Швец Сергей Витальевич, главный эксперт  
лаборатории Биотехнологических  
препаратов  
27.04.2022

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации



- Обоснование подхода к идентификации технологических примесей и продуктов деградации, элюирующихся в одной области и относящихся к разным действующим веществам в многокомпонентных лекарственных препаратах.
- Проблемы и сложности, возникающие в ходе испытаний ЛС данной группы.
- Основные ошибки при разработке методик определения родственных примесей в ЛС данной группы.
- Рекомендации к изложению методик в стандартах качества ЛС, требования к материалам по валидации, представленным в регистрационном досье.



## Требования к идентификации родственных примесей для каждого из действующих веществ (технологических и продуктов деградации)



- Технологические (производственные) примеси, как правило, исключаются из расчета содержания примесей в лекарственном препарате, так как их содержание контролируется в субстанции.
- Содержание каждого из действующих веществ в лекарственном препарате может значительно различаться, вследствие чего расчет содержания примесей для каждого из компонентов должен проводиться относительно соответствующего компонента в лекарственном препарате.
- Факторы отклика примесей, как правило, отличаются от факторов отклика основных веществ. В этом случае расчет содержания примесей без учета соответствующих факторов отклика будет приводить к получению ложных результатов.
- Для некоторых продуктов деградации допускается нормирование содержания на уровне, значительно превышающем допустимый уровень содержания неидентифцированных примесей, и, наоборот, для токсичных примесей уровень их содержания нормируется на уровне ниже, чем для неидентифцированных примесей, что обуславливает дифференцированный подход при определении родственных примесей.



- Идентификация примесей по относительным временам удерживания (или приведенным относительным временам удерживания).
- Идентификация примесей с использованием соответствующих фармакопейных стандартных образцов или стандартных образцов фирмы.
- Идентификация примесей с использованием образцов ЛС с повышенным содержанием примесей, подвергнутых обработке в «стрессовых» условиях.
- Оптимально, для идентификации примесей в многокомпонентных препаратах использовать комбинацию всех вышеперечисленных способов



- Корректно идентифицировать технологические примеси и продукты деградации только по относительным временам удерживания (RRT), указанным в нормативной документации, практически невозможно.
- Количество примесей, подлежащих идентификации в многокомпонентных препаратах, может достигать до нескольких десятков, при этом различия в значениях RRT могут не превышать нескольких сотых.
- Значения RRT примесей, полученные при валидации методики и указанные в нормативной документации, могут отличаться от фактически полученных при проведении испытания значений RRT для тех же примесей, что может быть обусловлено различием в части используемого оборудования, хроматографических колонок и реактивов при валидации методики и проведении испытания в контрольно-аналитической лаборатории.



- Стандартные образцы примесей могут использоваться для их идентификации и проверки пригодности хроматографической системы в части оценки разделительной способности системы.
- Могут использоваться стандартные образцы индивидуальных примесей или комбинированные стандартные образцы, содержащие несколько примесей, относящихся к одному из действующих веществ. Например, фармакопейные стандартные образцы для идентификации пиков или проверки пригодности системы, или аналогичные стандартные образцы фирмы.



## Идентификация примесей с использованием образцов, подвергнутых обработке в «стрессовых» условиях.



- Образцы с повышенным содержанием примесей, полученные при обработке в «стрессовых» условиях, могут использоваться для их идентификации примесей и проверки пригодности хроматографической системы в части оценки разделительной способности системы.
- Условия обработки образцов в «стрессовых» условиях должны быть валидированы и стандартизованы по количеству образующихся основных продуктов деградации, участвующих в дальнейшей идентификации примесей и проверке пригодности хроматографической системы (так называемых реперных пиков) и их ориентировочному содержанию.
- В этом случае в нормативной документации должны быть представлены типичные хроматограммы образцов подвергнутой «стрессовой» обработке с идентификацией реперных пиков, указанием их времен удерживания и относительных времен удерживания.
- Растворы, используемые для проверки разрешения и идентификации пиков, могут иметь названия: раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор для идентификации пиков и др.



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

# Монография Ф. США «Lopinavir and Ritonavir Tablets».

## Технологические примеси и продукты деградации ритонавира.



РегЛек – ЕАЭС

Name	Relative Retention	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
N-Deacylvaline ritonavir <sup>a</sup>	0.11	0.81	0.2
Acetamidoalcohol <sup>b</sup>	0.15	—	—*
2,5-Thiazolylmethyl dicarbamate <sup>c</sup>	0.24	—	—*
Hydroxyritonavir <sup>d</sup>	0.36	0.86	0.3
Hydantoin aminoalcohol <sup>e</sup>	0.39	0.73	2.6
Ritonavir hydroperoxide <sup>f</sup>	0.44	0.88	0.2
Hydantoin-oxazolidinone derivative <sup>g</sup>	0.50	—	—*
Ethyl analog <sup>h</sup>	0.64	—	—*
O-Acyl isomer <sup>i</sup>	0.74	1.1	0.2
BOC-aminoalcohol <sup>j</sup>	0.81	—	—*
Isobutoxycarbonyl aminoalcohol <sup>k</sup>	0.81	—	—*
Oxazolidinone derivative <sup>l</sup>	0.87	0.53	0.3
Ureidovaline isobutyl ester <sup>m</sup>	0.94	—	—*
Ritonavir	1.0	—	—*
4-Hydroxy isomer <sup>n</sup>	1.05	—	—*
3R-Epimer <sup>o</sup>	1.11	—	—*
Aminoalcohol urea derivative <sup>p</sup>	1.14	—	—*
3R,5R-Epimer <sup>q</sup>	1.23	—	—*
5R-Epimer <sup>r</sup>	1.32	—	—*
Diacyl valine urea <sup>s</sup>	1.70	—	—*
Any unspecified impurity	—	1.0	0.2**
Total impurities	—	—	3.5**





научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

## Монографии Ф. США «Lopinavir and Ritonavir Oral Solution».

### Технологические примеси лопинавира.



РегЛек – ЕАЭС

Name	Relative Retention Value (r)	Acceptance Criteria, NMT (%)
Lopinavir aminoalcohol <sup>a</sup>	0.06	__ <sup>b</sup>
LopinavirN-formylaminoalcohol <sup>c</sup>	0.12	__ <sup>b</sup>
Lopinavir divalinate <sup>d</sup>	0.21	__ <sup>b</sup>
Lopinavirphenoxyacetamide <sup>e</sup>	0.35	__ <sup>b</sup>
LopinavirN-formylphenoxyacetamide <sup>f</sup>	0.67	__ <sup>b</sup>
LopinavirN-acetylphenoxyacetamide <sup>g</sup>	0.69	__ <sup>b</sup>
Lopinavir oxazine <sup>h</sup>	0.77	__ <sup>b</sup>
Z-Diacylethenediamine <sup>i</sup>	0.92	__ <sup>b</sup>
Ritonavir	1.0	__ <sup>b</sup>
Isolopinavir <sup>j</sup>	1.18	__ <sup>b</sup>
Lopinavir 2,4-dimethylphenoxy isomer <sup>k</sup>	1.21	__ <sup>b</sup>
Lopinavir 4-epimer <sup>l</sup>	1.26	__ <sup>b</sup>
LopinavirD-valine diastereomer <sup>m</sup>	1.33	__ <sup>b</sup>
Lopinavir (2R,4R) diastereomer <sup>n</sup>	1.42	__ <sup>b</sup>
Lopinavir 2-epimer <sup>o</sup>	1.79	__ <sup>b</sup>
Any unspecified lopinavirimpurity	—	0.2 <sup>p</sup>
Total unspecified lopinavirimpurities	—	0.5 <sup>p</sup>



### Ritonavir degradant identification solution:

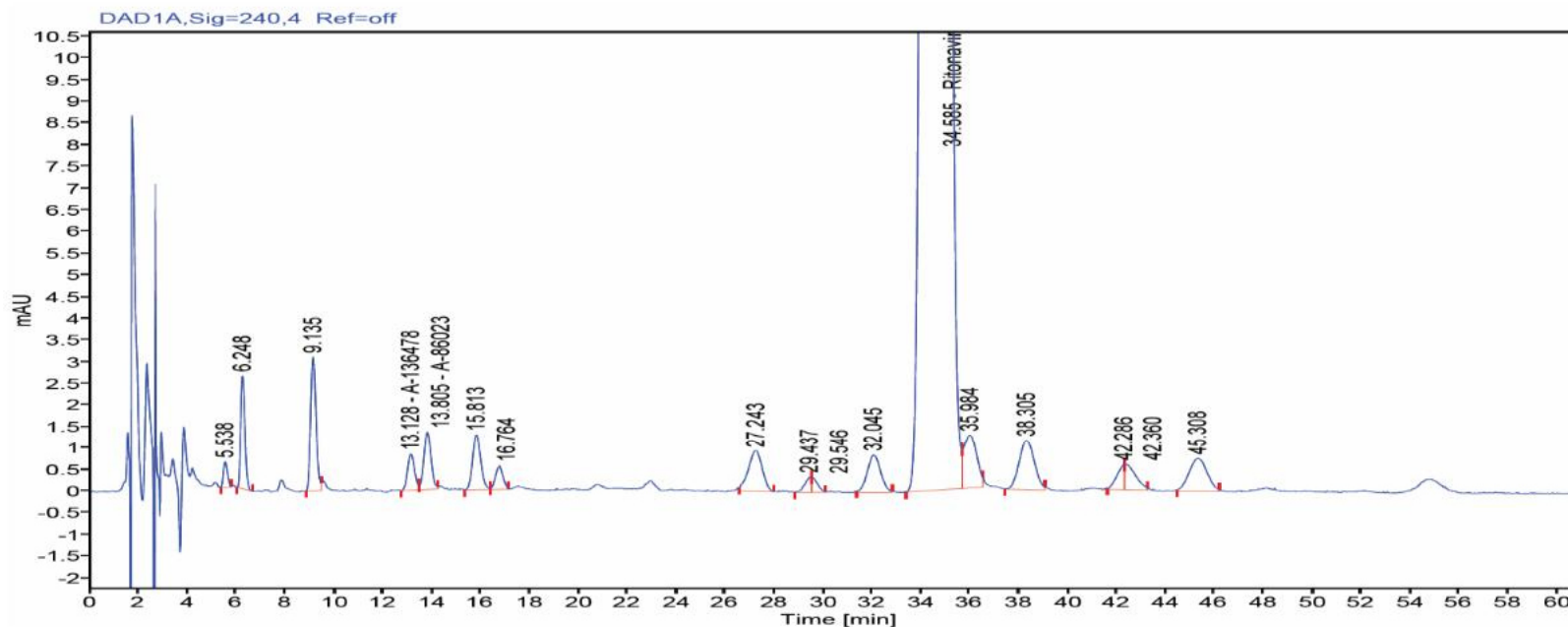
- Transfer two 5.0 mL portions of a 1 mg/mL solution of USP Ritonavir RS in Solution A to separate 50-mL volumetric flasks. Add 1 g of citric acid to one flask, and shake until dissolved. Heat both flasks at 80° for approximately 24 h. Cool the flasks, and add 13 mL of 1 N sodium hydroxide to the flask containing the citric acid. Dilute both flasks with *Solution B* to volume. Combine equal volumes of both solutions. This solution contains ritonavir and the ritonavir degradation products (*N*-deacylvaline ritonavir, hydantoin aminoalcohol, *O*-acyl isomer, and oxazolidinone derivative).

### Ritonavir related compounds identification solution:

- 1 mg/mL of USP Ritonavir Related Compounds Mixture RS dissolved in Solution C and further diluted with Solution B to 0.5 mg/mL.



## Типичная хроматограмма раствора СО смеси родственных соединений ритонавира (Ritonavir related compounds identification solution) при 240 нм



Name	Relative Retention	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
Hydroxyritonavir <sup>d</sup>	0.36	0.86	0.3
Hydantoin aminoalcohol <sup>e</sup>	0.39	0.73	2.6
Ritonavir	1.0	—	—*
4-Hydroxy isomer <sup>n</sup>	1.05	—	—*

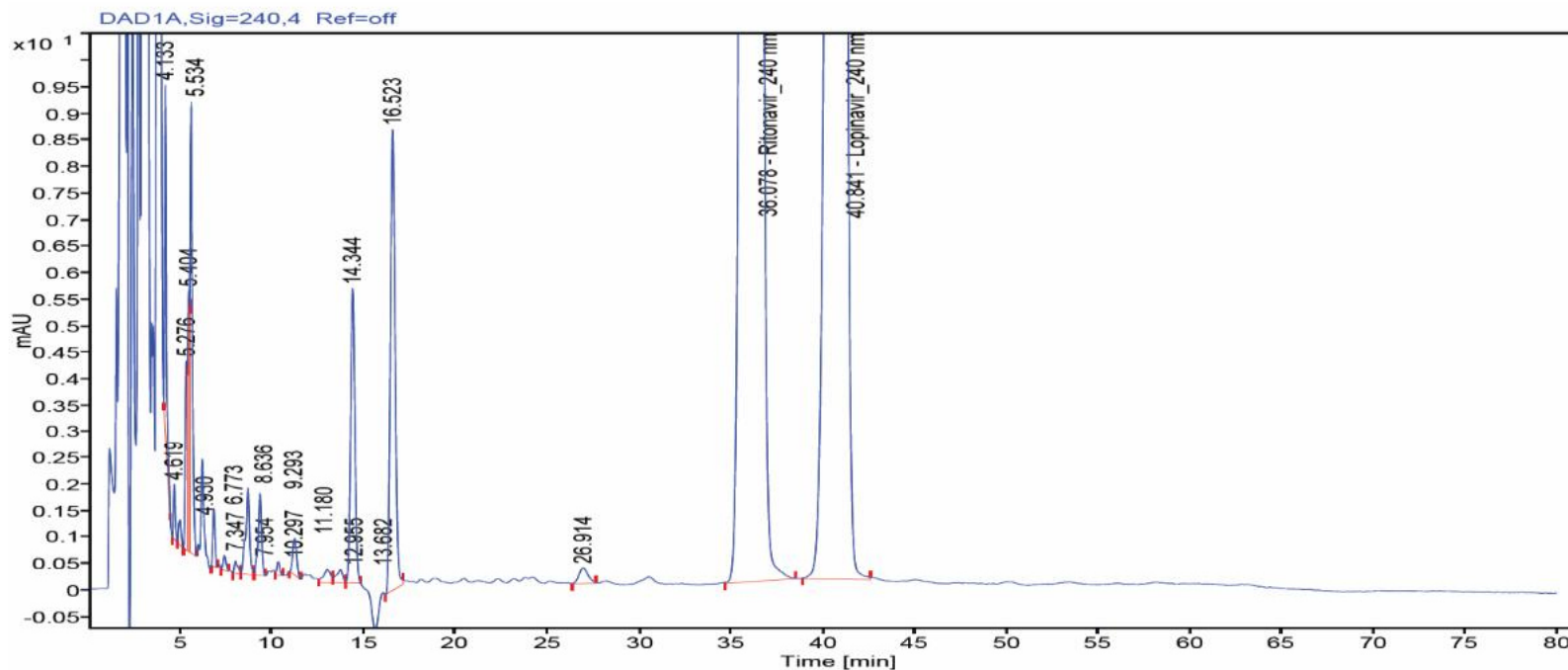


научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

## Типичная хроматограмма раствора для идентификации пиков (Ritonavir degradant identification solution) при 240 нм.



РегЛек – ЕАЭС



Name	Relative Retention	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
N-Deacylvaline ritonavir <sup>a</sup>	0.11	0.81	0.2
Hydantoin aminoalcohol <sup>e</sup>	0.39	0.73	2.6
O-Acyl isomer <sup>i</sup>	0.74	1.1	0.2
Oxazolidinone derivative <sup>l</sup>	0.87	0.53	0.3



## Suitability requirements

Resolution: NLT 1.0 between the peaks for *O*-acyl isomer and oxazolidinone derivative, *Ritonavir degradant identification solution*. NLT 0.7 between the peaks for hydroxyritonavir and hydantoin aminoalcohol, *Ritonavir related compounds identification solution*

Tailing factor: 0.8–1.2 for the ritonavir peak at 240 nm

Column efficiency: NLT 5000, *Standard solution*

Relative standard deviation: NMT 3.0% for the lopinavir peak at 215 nm; NMT 3.0% for the ritonavir peak at 240 nm





- На хроматограмме «холостого раствора» не должно наблюдаться значимых пиков при используемых длинах волн детектирования в области времен удерживания пиков примесей, относящихся к тому или другому действующему веществу.
- Фактически полученная хроматограмма раствора стандартного образца смеси родственных примесей (фармакопейного стандартного образца или стандарта фирмы) должна быть сопоставима с хроматограммой, прилагаемой к используемому стандартному образцу. На ней должны быть четко идентифицированы целевые (реперные) пики.
- Фактически полученная хроматограмма раствора образца, подвергнутого «стрессовой» обработке, должна быть сопоставима с хроматограммой данного раствора, представленной в нормативной документации. На ней должны быть четко идентифицированы целевые (реперные) пики.



- Проверка разделительной способности, по возможности, должна проводиться по оценке разрешения между наиболее близко элюирующимися (критическими) парами пиков. Критические пары пиков могут быть выбраны в зависимости от характера элюирования. Это могут быть пики основного вещества и близко элюирующейся примеси или пики двух близко элюирующихся примесей.
- Если возможности оценивать разрешение между наиболее близко элюирующимися пиками нет, то допустимо оценивать разрешение между любыми хорошо воспроизводимыми пиками. При этом установленные нормы к разрешению должны гарантировать эффективное разделение примесей по всему профилю хроматограммы.



- Проверка чувствительности хроматографической системы должна проводиться по оценке отношения сигнал/шум (не менее 10:1), которая проверяется для каждого из действующих веществ при используемой длине волны детектирования. Концентрация действующих веществ в растворе для проверки чувствительности системы должна соответствовать установленному пределу количественного определения методики или порогу игнорирования примесей (относительно содержания каждого из действующих веществ в испытуемом растворе).
- В методике проверки пригодности должна быть предусмотрена оценка хроматографических параметров пиков действующих веществ, которые участвуют в расчетах: относительное стандартное отклонение площади пика, фактора асимметрии пика и эффективность хроматографической колонки.



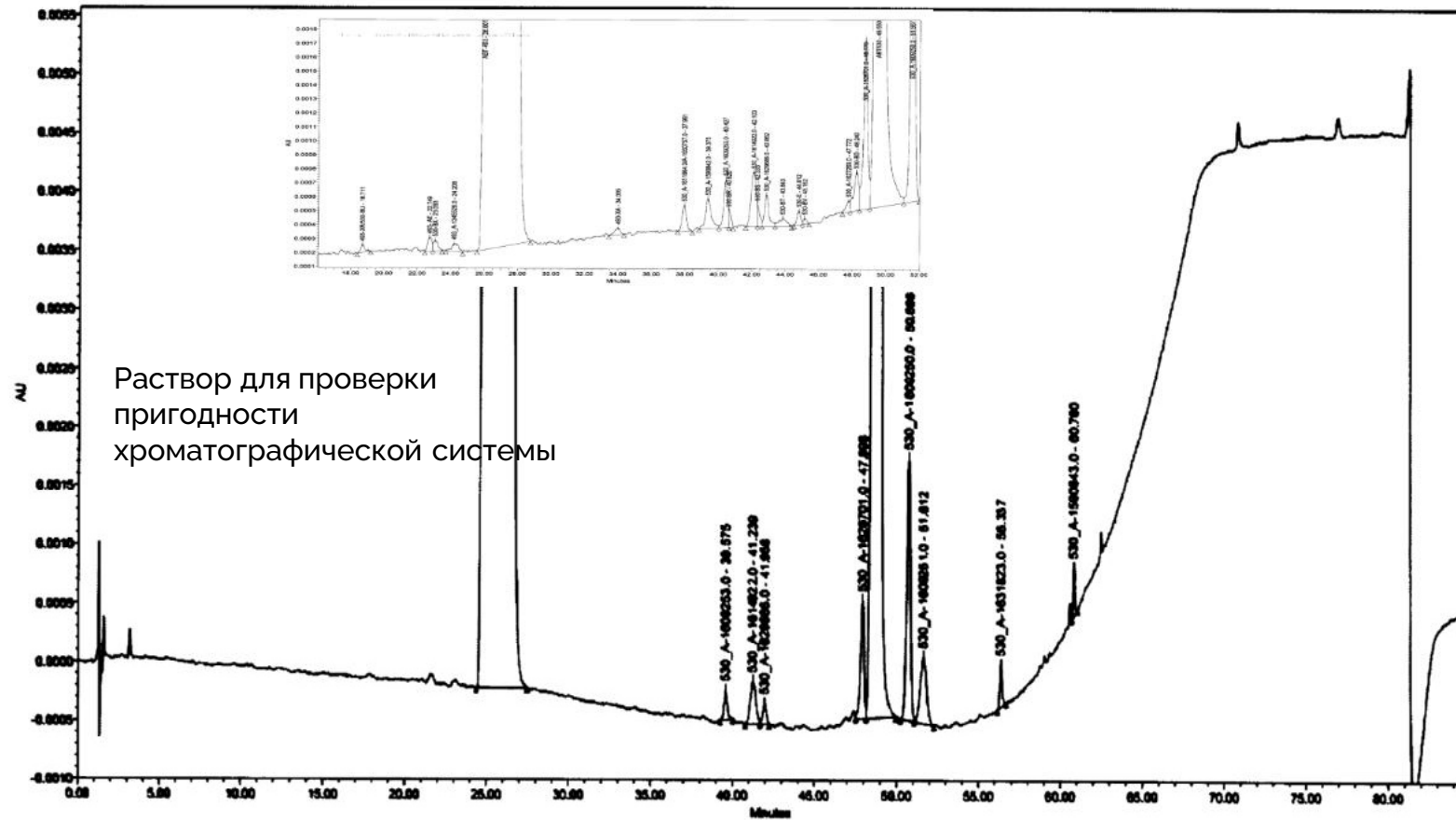


научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

# Проверка разделительной способности хроматографической системы.



РегЛек – ЕАЭС





## Рекомендуемый алгоритм идентификации технологических (производственных) примесей и продуктов деградации.



- На каждой хроматограмме интегрируют все пики независимо от длины волны. На следующей стадии пики идентифицируют и относят к конкретному действующему веществу.
- На хроматограмме раствора для идентификации пиков (проверки пригодности), фактически полученной при проведении испытания, определяют пики идентифицированных примесей путем сопоставления их относительных времен удерживания и порядка выхода пиков с относительными временами удерживания и порядком выхода соответствующих пиков указанных в нормативной документации, а также порядка выхода пиков на типичной хроматограмме раствора, приведенной в нормативной документации.
- Пики примесей, идентифицированные на хроматограмме раствора для идентификации пиков (проверки пригодности), фактически полученной при проведении испытания, используют в дальнейшем в качестве реперных пиков для идентификации пиков примесей на хроматограмме испытуемого раствора.
- Рассчитывают относительные времена удерживания пиков идентифицированных примесей на хроматограмме раствора для идентификации пиков (для проверки пригодности) фактически полученной при проведении испытания, и сравнивают с относительными временами удерживания, указанными в нормативной документации.



- В случае выявления эффекта смещения фактических значений относительных времен удерживания пиков примесей, присутствующих на фактической хроматограмме раствора для идентификации пиков, от значений относительных времен удерживания тех же примесей приведенных в нормативной документации, устанавливают наблюдаемое смещение и далее используют его для корректировки значений относительных времен удерживания остальных пиков примесей, приведенных в нормативной документации.
- Проводят идентификацию пиков, присутствующих на хроматограмме испытуемого раствора, используя данные фактической хроматограммы раствора для идентификации пиков и скорректированные при необходимости значения RRT пиков, приведенных в нормативной документации.
- Проводят дифференцированную оценку хроматограмм испытуемого раствора при разных длинах волн. В случае, если классификация (идентификация) отдельных пиков примесей, относящихся к конкретному действующему веществу, затруднена, проводят сравнение УФ-спектров данных примесей (по количеству и положению максимумов поглощения) с УФ-спектрами соответствующих действующих веществ, полученные с использованием диодно-матричного детектора.



## Рекомендуемый алгоритм идентификации технологических (производственных) примесей и продуктов деградации (продолжение).



- Если пики примесей относящихся к одному и тому же или разным действующими веществам элюируются в виде плохо разделенных или совсем не разделенных пиков, а также если одна и та же примесь детектируется в виде двух или нескольких пиков, это должно быть отдельно оговорено в нормативной документации и указан способ интегрирования таких пиков.
- Пики вспомогательных веществ необходимо идентифицировать путем сравнения значения их относительных времен удерживания с RRT на хроматограмме раствора плацебо и приведенными в проекте нормативной документации. При необходимости для идентификации пиков вспомогательных веществ используют УФ-спектры проверки разрешения, фактически полученной при проведении испытания, и сравнивают фактические относительные времена удерживания данных пиков с относительными временами удерживания, указанными в нормативной документации

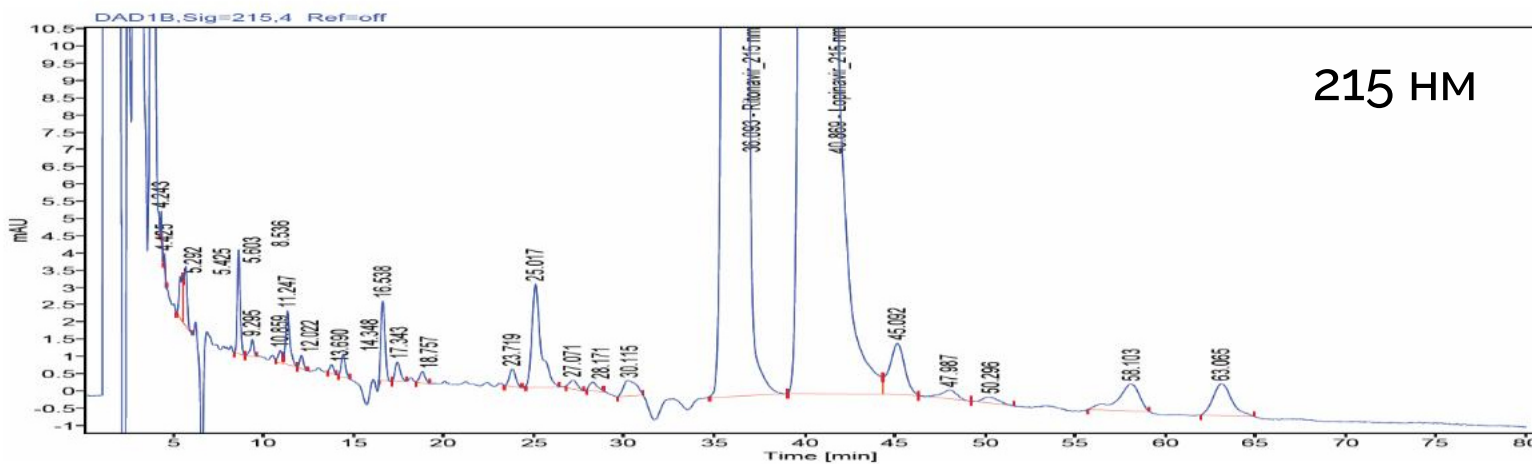
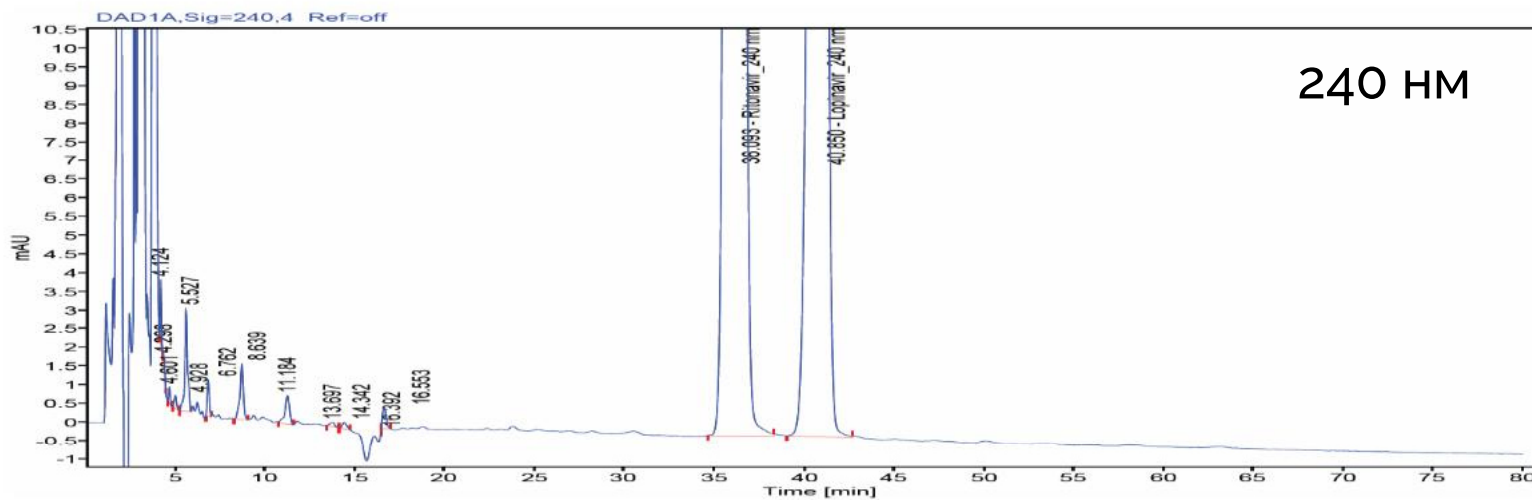


научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

## Типичные хроматограммы испытуемого раствора препарата (лопинавир + ритонавир) при 240 нм и 215 нм.



PerLek – ЕАЭС





## Дифференциальная оценка хроматограмм испытуемого раствора препарата (лопинавир + ритонавир) при 240 нм и 215 нм



- На хроматограмме испытуемого раствора при 240 нм идентифицируют технологические примеси и продукты распада ритонавира, используя данные фактической хроматограммы растворов для идентификации примесей ритонавира и скорректированных при необходимости значений относительных времен удерживания пиков, приведенных в нормативной документации.
- На хроматограмме испытуемого раствора при 215 нм идентифицируют технологические примеси лопинавира, используя данные фактической хроматограммы растворов для идентификации примесей лопинавира и скорректированных при необходимости значений относительных времен удерживания пиков, приведенных в нормативной документации.
- Сравнивают хроматограммы испытуемого раствора при 240 нм и 215 нм. Если пик на хроматограмме испытуемого раствора не идентифицирован при 215 нм как примесь лопинавира, но идентифицирован при 240 нм как примесь ритонавира, то данный пик должен быть определен как примесь ритонавира.



## Дифференциальная оценка хроматограмм испытуемого раствора препарата (лопинавир + ритонавир) при 240 нм и 215 нм (продолжение).



- Сравнивают хроматограммы испытуемого раствора при 240 нм и 215 нм. Если пик на хроматограмме испытуемого раствора не идентифицирован при 240 нм как примесь ритонавира, но идентифицирован при 215 нм как примесь лопинавира, то данный пик должен быть определен как примесь лопинавира.
- Сравнивают хроматограммы испытуемого раствора при 240 нм и 215 нм. Если пик на хроматограмме испытуемого раствора не идентифицирован при 240 нм как примесь ритонавира и при 215 нм не идентифицирован как примесь лопинавира, то данный пик должен быть определен как неидентифицированная примесь ритонавира.
- Сравнивают хроматограммы испытуемого раствора при 240 нм и 215 нм. Если пик на хроматограмме испытуемого раствора не идентифицирован при 215 нм как примесь лопинавира и не детектируется при 240 нм, то данный пик должен быть определен как неидентифицированная примесь лопинавира.



## Неправильное использование стандартных образцов.

- Например. При анализе препаратов лопинавира и ритонавира в соответствии с монографиями, представленными в Ф. США, для идентификации примесей и проверки пригодности хроматографической системы допустимо использовать стандартные образцы смеси родственных соединений ритонавира USP RS и ритонавира для идентификации пиков EP CRS. Однако, недопустимо использовать стандартных образцов лопинавира смеси для пригодности системы USP RS, лопинавира для пригодности системы EP CRS и лопинавира для идентификации пиков EP CRS. Использование фармакопейных стандартных образцов допустима только в соответствии с компендиальными требованиями.

## Необоснованное внесение изменений в фармакопейные методики.

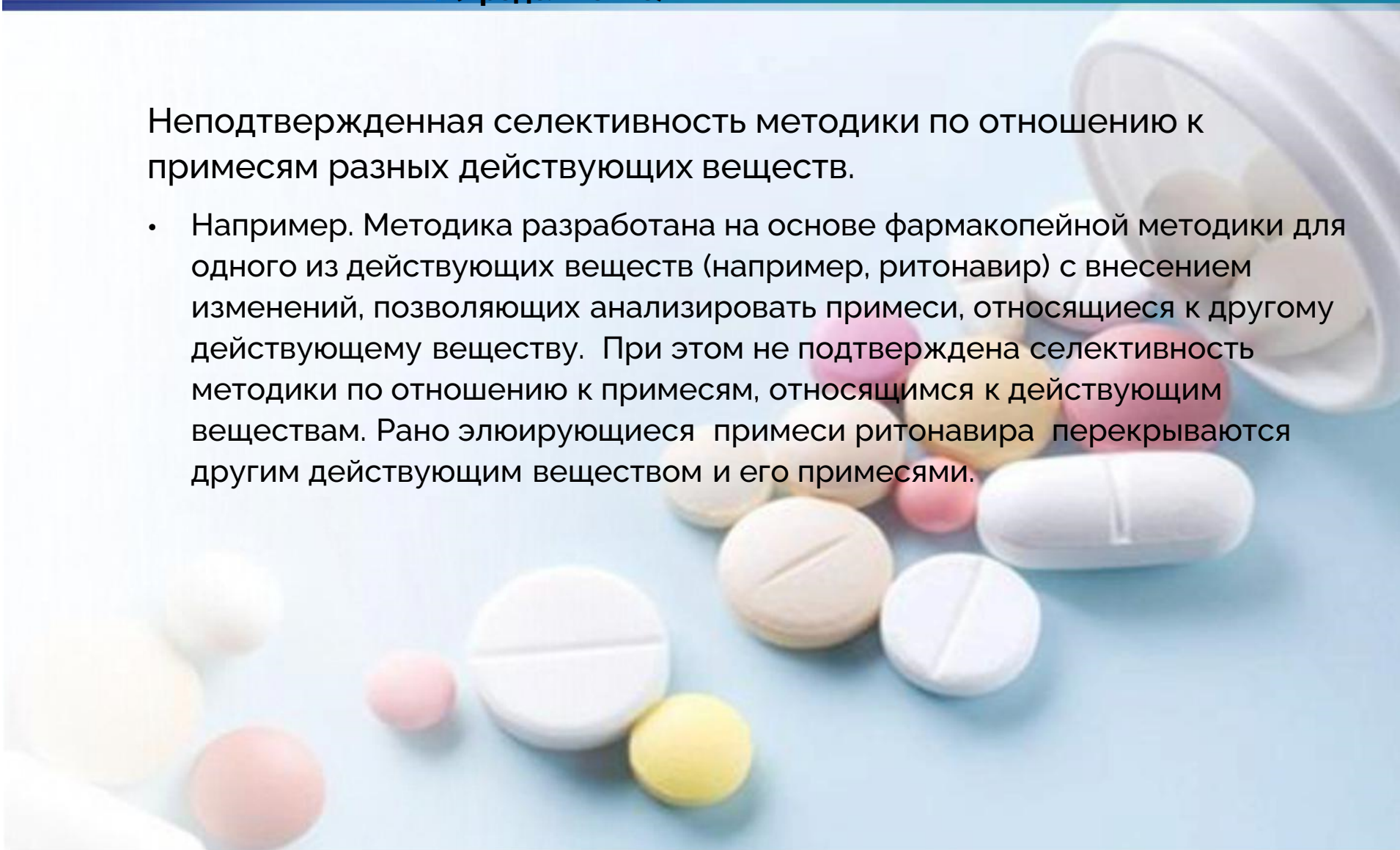
- Например. Условия проведения испытания в части используемых хроматографических колонок и условий хроматографирования отличаются от фармакопейных, при этом порядок элюирования пиков, значения относительных времен удерживания и факторов отклика примесей указаны в соответствии с монографией. При внесении изменений в фармакопейную методику необходимо представлять полные данные по валидации.





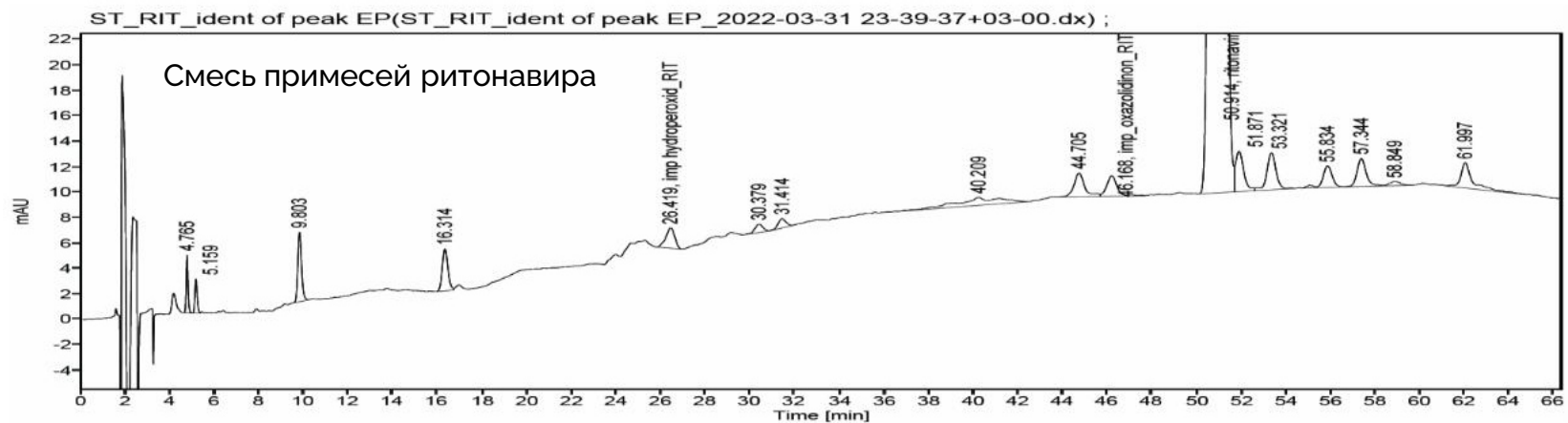
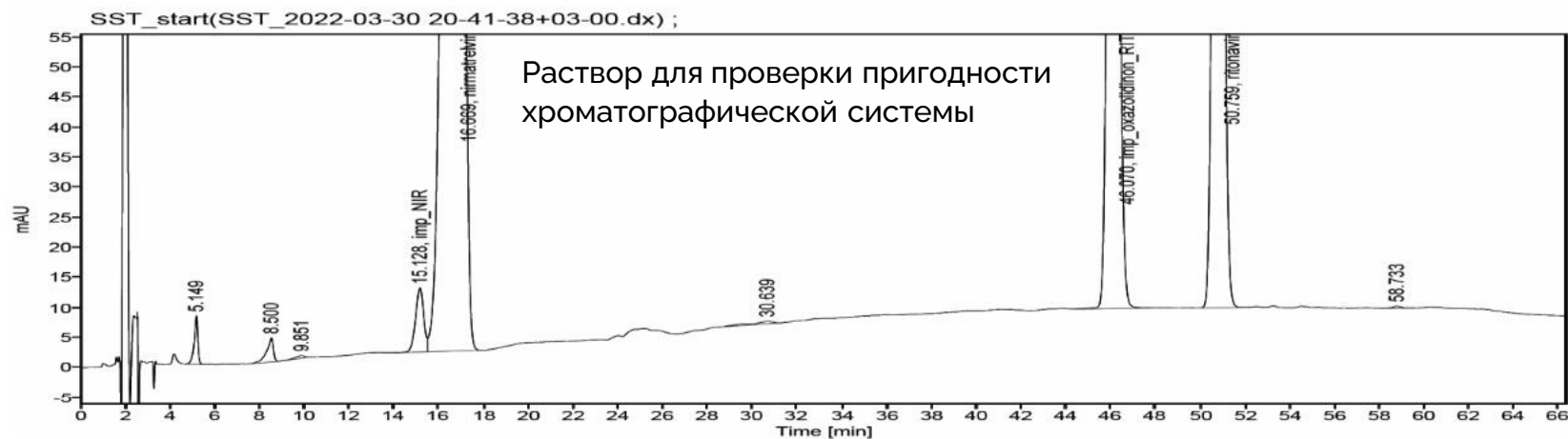
Неподтвержденная селективность методики по отношению к примесям разных действующих веществ.

- Например. Методика разработана на основе фармакопейной методики для одного из действующих веществ (например, ритонавир) с внесением изменений, позволяющих анализировать примеси, относящиеся к другому действующему веществу. При этом не подтверждена селективность методики по отношению к примесям, относящимся к действующим веществам. Рано элюирующиеся примеси ритонавира перекрываются другим действующим веществом и его примесями.





## Типичные ошибки при разработке методик определения родственных примесей в многокомпонентных лекарственных ЛС (продолжение).





## Типичные ошибки при разработке методик определения родственных примесей в многокомпонентных лекарственных ЛС (продолжение).



Name	Relative Retention	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
N-Deacylvaline ritonavir <sup>a</sup>	0.11	0.81	0.2
Acetamidoalcohol <sup>b</sup>	0.15	—	—*
2,5-Thiazolylmethyl dicarbamate <sup>c</sup>	0.24	—	—*
Hydroxyritonavir <sup>d</sup>	0.36	0.86	0.3
Hydantoin aminoalcohol <sup>e</sup>	0.39	0.73	2.6
Ritonavir hydroperoxide <sup>f</sup>	0.44	0.88	0.2
Hydantoin-oxazolidinone derivative <sup>g</sup>	0.50	—	—*
Ethyl analog <sup>b</sup>	0.64	—	—*
O-Acyl isomer <sup>i</sup>	0.74	1.1	0.2
BOC-aminoalcohol <sup>j</sup>	0.81	—	—*
Isobutoxycarbonyl aminoalcohol <sup>k</sup>	0.81	—	—*
Oxazolidinone derivative <sup>l</sup>	0.87	0.53	0.3
Ureidovaline isobutyl ester <sup>m</sup>	0.94	—	—*
Ritonavir	1.0	—	—*



PerLek – EAES

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения