

1 – Автономное объединение «ШТАДА ФармДевелопмент» АО «НИЗФАРМ», 109029, Россия, г. Москва, Автомобильный проезд, 6

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», JSC «NIZHPHARM», 6, Avtomobilnyy proyezd, Moscow, 109029, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: naumepshtein@gmail.com  
Тел.: 8 (985) 771 73 59

# О СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПРИ РАЗРАБОТКЕ / УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК И ТЕХНОЛОГИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ И ПРЕПАРАТОВ

Н.А. Эпштейн<sup>1\*</sup>

**Резюме.** Подробно рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие им испытания, а также стрессовые эксперименты для приготовления растворов для проверки пригодности хроматографических систем. Предложен подход для систематизации и анализа результатов стрессовых экспериментов (стресс-исследований). Этот подход основан на использовании относительных времен выхода пиков и специальной таблицы, которая дает возможность надежно выявлять перекрывающиеся пики на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов; это особенно важно для разработки и валидации аналитических методик. Таблица также дает возможность соотнести пики примесей с определенными типами негативных химических реакций разложения/превращения лекарственных веществ. Даны рекомендации по проведению стрессовых экспериментов, которые, несомненно, будут полезны на практике.

**Ключевые слова:** стрессовые эксперименты, стресс-исследования, лекарственные вещества, лекарственные препараты, стабильность, методики, валидация.

## ABOUT STRESS EXPERIMENTS BY DEVELOPING / IMPROVING ANALYTICAL METHODS AND TECHNOLOGY OF DRUG SUBSTANCES AND MEDICINES

N.A. Epshtein<sup>1\*</sup>

**Abstract.** The main objectives of stress experiments and tests corresponding to them, and also stress experiments for preparation of solutions for check of system suitability of chromatographic systems are in detail considered. Approach for systematization and the analysis of results of stress experiments (stress testing) is offered. This approach is based on use of relative times of peaks of substances and on the special table, which allows resolving overlapping peaks before and after stress tests with high confidence; it is especially important for development and validation of the analytical methods. The table also gives the possibility to correlate peaks of impurity to certain types of negative chemical reactions of decomposition/transformation of drug substances. Recommendations are presented for conducting stress tests, which would be without doubts a great help in practice.

**Keywords:** stress testing, stress experiments, drug substances, drugs, medicines, stability, methods, validation.

## ВВЕДЕНИЕ

Под стрессовыми экспериментами (стресс-исследованиями, stress testing) понимают такие эксперименты, которые проводятся при более сильном, чем обычно, воздействии факторов, способных влиять на свойства объекта исследования. В отношении лекарственных веществ и смесей основными факторами стрессового воздействия являются: температура, действие воды или ее паров, кислая или щелочная среда, окислители (обычно кислород воздуха), углекислый газ, реакционноспособные примеси из вспомогательных веществ, действие света, а также механохимическое воздействие и действие ультразвука [1]. Известно, что стрессовые экспери-

менты играют важную роль при решении ряда задач в фармации: при разработке и валидации аналитических методик; при исследовании возможности взаимодействия (совместимости) лекарственных и вспомогательных веществ; при экспрессной, предварительной оценке стабильности лекарственных субстанций и препаратов; при подборе подходящей упаковки и т.д. Этому посвящено много публикаций. К сожалению, как правило, в публикациях при обсуждении результатов стрессовых экспериментов используют визуальное сравнение хроматограмм и/или таблицу времени выхода пиков (RT) на хроматограммах, что недостаточно<sup>1</sup>. То же самое наблюдалось автором статьи и в ходе многочисленных экспертных оценок валидационной документации

<sup>1</sup> Перекрывание пиков примесей на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов неоднократно наблюдалось нами в ходе разработки аналитических методик при использовании подхода, предлагаемого в данной статье. Однако когда для тех же хроматограмм составляли единую таблицу «RT примеси – ее содержание в %», то часто не видели перекрывание пиков (получали большее количество пиков, причем некоторым, близким RT в таблице, как оказалось, соответствовала одна и та же примесь).

отечественных и иностранных фирм. Однако сравнение хроматограмм до и после стрессовых экспериментов с использованием времени выхода пиков связано с риском неправильных выводов. Дело в том, что значения  $R_T$  на хроматограммах могут существенно изменяться (сдвигаться в ту или иную сторону) в ходе стрессовых экспериментов даже при небольшом, практически неизбежном, варьировании характеристик подвижной фазы (соотношения компонентов, pH, ионной силы и т.д.). Поэтому высока вероятность того, что даже при сравнении  $R_T$  пиков до и после стрессовых экспериментов в одной таблице, не говоря уже о визуальном сравнении хроматограмм, не будет установлено перекрытие близко расположенных пиков. Это может привести к неправильной идентификации пиков примесей, что особенно критично при использовании поправочных коэффициентов, наличии большого количества пиков на хроматограммах после стрессовых экспериментов, а также при отнесении пиков примесей к соответствующим лекарственным веществам в многокомпонентных препаратах.

Цель статьи: а) рассмотреть основные стрессовые эксперименты<sup>1</sup> и дать по ним рекомендации; б) предложить подход для оценки результатов стрессовых экспериментов, сводящий к минимуму упомянутый выше риск (этот подход показал высокую эффективность на практике); в) предложить специальную таблицу, дающую возможность связать образование пиков примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных веществ с определенными негативными химическими реакциями; г) рассмотреть наиболее полезную, на взгляд автора, литературу по стрессовым экспериментам и связанным с ними вопросам.

### ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР ПО ПРОВЕДЕНИЮ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Прежде всего, подчеркнем, что в основных руководствах ICH, EMEA и национальных регуляторных органов приводятся очень краткие и сравнительно малоинформативные рекомендации по проведению стрессовых экспериментов (за исключением фотостабильности) [2–5]. Это, по-видимому, связано как с тем, что такие руководства дают только рекомендации общего типа, так и с многообразием условий стрессовых экспериментов, сильно зависящих от свойств молекул исследуемых веществ и смесей, а также от поставленных задач.

В настоящее время наиболее полное рассмотрение стрессовых экспериментов представлено в книге [1], главы которой написаны ведущими специалистами

ми в различных областях фармации. В [1] рассмотрены следующие основные вопросы: стрессовые эксперименты как инструмент прогноза [глава (2)]; химические реакции разложения лекарственных веществ (3); особенности проведения стрессовых экспериментов – условия испытаний и подготовка образцов (4); исследование восприимчивости веществ к окислению (6), тестирование фотостабильности (7, 8); совместимость лекарственных и вспомогательных веществ (11). При этом в большинстве глав обсуждаются также стрессовые эксперименты в связи со стабильностью лекарственных веществ и препаратов. Очевидно, что в [1] представлены взгляды авторов соответствующих разделов, которые не являются всеобъемлющими. Поэтому можно порекомендовать также ряд обзоров и публикаций по стрессовым экспериментам и связанным с ними вопросам (компьютерный прогноз потенциально возможных примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных веществ, идентификация примесей, механизмы реакций в твердой фазе и т.д.).

В русскоязычной литературе можно выделить обзор [6], в котором рассмотрены стресс-исследования в основном с регуляторной точки зрения и более подробно – исследование фотостабильности. При этом исследование фотостабильности рассматривается отдельно от стресс-исследований. По-видимому, это вызвано тем, что фотостабильности посвящено специальное руководство ICH [4], хотя по смыслу тестирование фотостабильности является частью стресс-исследований. В [7] рассмотрены необходимые стрессовые эксперименты для разработки так называемых Stability-Indicating Methods, то есть методик, предназначенных для исследования и контроля стабильности лекарственных субстанций и препаратов. В [8] рассмотрены особенности организации стрессовых экспериментов при действии окислителей и интерпретации получаемых результатов.

Следует отметить презентацию [9], в которой обсуждаются специальные подходы и компьютерные программы для прогноза возможных продуктов разложения/превращения лекарственных веществ. Компьютерная программа Pharma D3 (CambridgeSoft Pharmaceutical Drug Degradation Database) [10] имеет online-версию. Она дает возможность прогнозировать образование определенных примесей и связанных с ними вероятных механизмов деградации лекарственных веществ на основании базы данных для нескольких сотен молекул лекарственных веществ («базовых» молекул). Ее достоинством является то, что она основывается на фактических данных по определению примесей при хранении лекарственных веществ и препаратов, а недостатком – то, что она может ис-

<sup>1</sup> В статье не рассматриваются дополнительные стрессовые эксперименты, которые могут потребоваться для мягких лекарственных форм, например охлаждение/замораживание.

пользоваться только для молекул, химическая структура которых может быть получена добавлением или удалением небольших химических фрагментов относительно структуры «базовых» молекул. Компьютерная программа Zeneth Chemical Degradation Prediction Software [11] лишена этого недостатка: она позволяет вводить любые химические структуры, прогнозировать потенциальные примеси не только для процессов деструкции, но и для бимолекулярных реакций взаимодействия молекул, а также для фотохимических реакций. Однако эта программа не ориентирована на лекарственные вещества и препараты. В связи с этим для лекарственных веществ при прогнозе с помощью программы Zeneth Chemical Degradation Prediction Software можно ожидать получения всех теоретически возможных продуктов деструкции/превращения, а не только наиболее реальных, как в случае программы Pharma D3. Тем не менее обе упомянутые выше компьютерные программы оказались полезными при идентификации пиков примесей на хроматограммах по массам фрагментов с помощью масс-спектрометрических детекторов [9].

В связи с идентификацией примесей – продуктов стрессовых экспериментов представляет интерес книга [12]. В ней рассмотрены практически все методы определения примесей в лекарственных веществах и препаратах. Можно выделить также обзор [13], в котором обсуждены методики определения продуктов деструкции 197 лекарственных веществ и приведена обобщающая таблица с указанием хроматографических колонок и состава подвижных фаз, используемых при идентификации примесей. Следует обратить внимание на то, что требования ИСН к идентификации примесей в лекарственных веществах и в препаратах существенно различаются. Это необходимо учитывать как при обосновании нормирования содержания примесей, так и при обсуждении результатов стрессовых экспериментов в связи с прогнозом стабильности лекарственных веществ и препаратов. Согласно ИСН для лекарственных веществ должны быть идентифицированы все примеси, содержание которых превышает 0,1% при суточной дозе препарата  $\leq 2$  г или превышает 0,05% при суточной дозе препарата  $> 2$  г [14]. Для лекарственных препаратов эти требования менее жесткие [15] (таблица 1).

Важным при планировании, проведении и интерпретации стрессовых экспериментов является понимание механизмов химических процессов. Для жидких фаз, как правило, достаточно знаний, полученных при высшем химическом образовании. Однако для понимания реакций, протекающих в твердых фазах, особенно в связи с задачами прогнозирования стабильности и взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ, необходимы дополнительные знания по механизмам твердофазных реакций. Пока-

зателен случай, имевший место при обсуждении проблемы стабильности препарата на одной из производственных площадок. Было высказано предположение, что на стабильность препарата оказывает влияние гидролиз молекул лекарственного вещества в присутствии стеарата магния. Однако это предположение не устроило технологов и химиков производственной площадки: они возразили, что стеарат магния является твердым веществом и поэтому не может вызывать гидролиз лекарственного вещества при хранении препарата. Впоследствии наше предположение было подтверждено результатами стрессовых экспериментов, а также сравнительным исследованием стабильности исходного препарата и аналогичного опытно-промышленного образца, в котором стеарат магния был заменен на другой лубрикант. При планировании стрессовых экспериментов и обсуждении их результатов надо иметь в виду, что твердофазные реакции могут резко ускоряться в присутствии даже небольшого количества воды. Более того, в твердой фазе в микроокружении катионов магния и щелочных металлов и анионов сильных кислот в присутствии молекул воды могут существовать микрообласти соответственно со щелочным и с кислым pH – «microenvironmental pH», способные вызывать гидролиз лекарственных веществ в твердой фазе [16]. Для понимания возможных механизмов реакций лекарственных веществ в твердой фазе можно порекомендовать книгу [1] и обзор [17], а для реакций взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ – обзор [18].

Таблица 1.

Требования ИСН к идентификации примесей в зависимости от максимальной дневной дозы (TDI) лекарственного препарата [15]

Максимальная дневная доза (Maximum Daily Dose)	Предел содержания примеси, выше которого она должна быть идентифицирована (Threshold)
<1 мг	1,0% или 5 мкг TDI – то, что меньше
1–10 мг	0,5% или 20 мкг TDI – то, что меньше
>10 мг – 2 г	0,2% или 2 мг TDI – то, что меньше
>2 г	0,1%

Имеется много публикаций по использованию термических методов анализа, таких как ДСК, ТГА, изотермическая калориметрия, термомикроскопия, для прогнозирования взаимодействия и совместимости лекарственных и вспомогательных веществ, в том числе в русскоязычной литературе [19]. Эти методы явля-

ются универсальными, экспрессными и легко применимы ко всем веществам и смесям. К сожалению, они в большинстве случаев недостаточны для надежного прогноза совместимости лекарственных и вспомогательных веществ. Тем не менее методы термического анализа полезны при объяснении результатов стрессовых экспериментов. Они дают возможность устанавливать процессы, влияющие на совместимость лекарственных и вспомогательных веществ, которые не обнаруживаются традиционными аналитическими методами. К таким процессам относятся плавление отдельных компонентов смесей, кристаллизация, полиморфные переходы, образование эвтектических смесей и т.д. [20].

### ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

При проведении стрессовых экспериментов следует придерживаться следующих основных правил:

- 1. Стрессовые эксперименты должны проводиться таким образом, чтобы свести к минимуму образование примесей вследствие вторичных реакций.** Основание: во-первых, такие реакции маловероятны как при хранении лекарственных субстанций, препаратов и их продуктов, так и при технологических процессах; во-вторых, пики продуктов вторичных реакций могут перекрываться с пиками основных веществ и пиками примесей, которые реально могут образовываться при получении и хранении лекарственных веществ и препаратов. Из-за этого могут возникнуть более жесткие, часто невыполнимые требования к разделяющей способности методики определения примесей. Для сведения к минимуму вторичных реакций, протекание которых маловероятно при получении и хранении лекарственных веществ и препаратов, рекомендуем, чтобы разложение (превращение) основного вещества не превышало 5% при стрессовых экспериментах с окислением и 20% – в остальных случаях. Более низкий допустимый предел разложения при стрессовых экспериментах с окислением связан с тем, что при окислении протекают многочисленные радикальные реакции, а так как они имеют низкую энергию активации, увеличивается риск вторичных реакций.
- 2. Надо стремиться к тому, чтобы растворы до и после стрессовых экспериментов имели близкие концентрации основного вещества;** при этом логично ориентироваться на номинальную концентрацию основного вещества в ис-

пытуемом растворе по методике определения примесей.

- 3. На хроматограммах растворов после стрессовых экспериментов следует контролировать (определять) спектральную чистоту пиков основных веществ и пиков примесей, для которых требуется использовать поправочные коэффициенты.** Это важно прежде всего для доказательства специфичности аналитических методик. Оценка спектральной чистоты пиков можно легко проводить с помощью диодно-матричных детекторов и специальных программ, входящих в пакеты обработки хроматографических данных современных хроматографов. Например, в случае хроматографов Waters можно использовать графики Peak Purity<sup>1</sup> и/или проверять выполнение соотношения Purity Angle < Purity Threshold. Если окажется, что пик основного вещества или пик какой-то из примесей, для которой требуется использовать поправочные коэффициенты, не является спектрально чистым, то это сигнал о необходимости доработки методики определения примесей: надо улучшить разделяющую способность хроматографической системы. В качестве исключения из этого правила можно рассматривать пики примесей, которые, во-первых, расположены вблизи базовой линии основного пика (на нисходящей или восходящей ветви), во-вторых, не требуют использования поправочных коэффициентов и, в-третьих, при нормируемом содержании могут быть однозначно (воспроизводимо) отделены от пика основного вещества, то есть  $p/v$  – не менее 1,5 [21]. В пользу этого говорит возможность использования коэффициента  $p/v$  (peak-to-valley ratio) для частично перекрывающихся (то есть не спектрально чистых) пиков в Европейской Фармакопее [22]. В таких случаях, как правило, достаточно проводить оценку спектральной чистоты пика основного вещества без учета пика примеси на переднем или заднем «хвосте», проводя базовую линию под пиком основного вещества до точки valley (нижней точки впадины) между пиком основного вещества и пиком примеси.

Факторы, воздействие которых тестируется в стрессовых экспериментах, и связанные с ними химические и физические процессы систематизированы в таблице 2. В этой же таблице приведены характерные химические и физические процессы, вызываемые упомянутыми выше факторами.

<sup>1</sup> Графики типа Peak Purity имеют преимущество, так как они дают возможность надежнее определять наличие пика примеси под пиком рассматриваемого вещества, а также локализацию пика примеси.

Таблица 2.

Факторы стрессовых экспериментов и химические и физические процессы, вызываемые их действием на лекарственные вещества и смеси

№	Факторы стрессовых экспериментов	Химические и физические процессы	Моделирование	Примечание
1.	Температура	Термическое разложение. Термоокислительная деструкция в присутствии кислорода воздуха. Полиморфные переходы. Плавление.	Нагревание веществ и смесей в сушильном шкафу, в климатической камере или плавление (в случае очень стабильных веществ) в зависимости от задачи исследования (таблица 3)	При выборе температуры стрессовых экспериментов для прогноза стабильности лекарственных веществ и препаратов следует учитывать правило: чем выше температура стрессовых экспериментов, тем менее точен прогноз стабильности. Причина: при повышении температуры увеличивается вклад в разложение/превращение веществ тех реакций, которые имеют более высокую энергию активации, а эти реакции могут быть иными, чем скоростьопределяющие реакции при температуре хранения.
2	Действие окислителей, включая кислород воздуха	Химические реакции окисления	Взаимодействие вещества с окислителем при нагревании, при комнатной температуре или при охлаждении. Если используют нагревание, то для минимизации вторичных реакций лучше нагревать навеску лекарственного вещества с небольшим объемом раствора окислителя.	В качестве окислителя чаще всего используют раствор перекиси водорода. Условия стрессовых экспериментов сильно зависят от легкости/трудности окисления молекул основного вещества (см. текст статьи). При этом может образовываться много продуктов окисления. Задача – свести к минимуму вторичные реакции. Для этого следует ограничить разложение основного вещества: не более 5% (обычно достаточны 2–3%).
3	Действие света	Фотохимические процессы	Облучение вещества или смеси в соответствии с рекомендациями ИСН по исследованию фотостабильности.	
4	Действие воды или ее паров	Гидролиз из-за взаимодействия с водой при повышенной температуре	Нагревание веществ и смесей в присутствии воды в сушильном шкафу или при повышенной относительной влажности в климатической камере.	Как правило, образуется сравнительно немного продуктов разложения. Часто можно идентифицировать пики как пики «родственных примесей» с помощью диодно-матричного детектора путем сравнения спектров основного вещества со спектрами пиков примесей.
5	Действие кислой среды	Кислотный гидролиз	Нагревание веществ и смесей, как правило, в 1 М HCl.	То же.
6	Действие щелочной среды	Щелочной гидролиз	Нагревание веществ и смесей, как правило, в 1 М NaOH.	То же.
7	Химическое взаимодействие компонентов лекарственной формы	Кислотно-основные или окислительно-восстановительные реакции, образование аддуктов и т.д.	Нагревание веществ и смесей в сушильном шкафу или в климатической камере.	То же.
8	Реакционноспособные примеси (РСП) из вспомогательных веществ	То же	Нагревание лекарственных (ЛВ) и вспомогательных (ВВ) веществ и модельных смесей ЛВ с РСП с последующим сопоставлением хроматограмм.	Для препаратов с очень низкими дозировками, для которых содержание РСП $\geq 0,1\%$ от содержания лекарственного вещества.
9	Углекислый газ		Выдерживание веществ и смесей в атмосфере углекислого газа при комнатной и при повышенной температуре.	Химическое взаимодействие встречается редко, например в случае молекул, обладающих сильными щелочными свойствами, в присутствии влаги (воды).
10	Механохимическое воздействие	Химические процессы деструкции при растирании, дроблении или прямом прессовании	Обычно используют энергичное растирание в фарфоровой ступке.	Встречается редко.
11	Действие ультразвука при приготовлении растворов	Химические процессы деструкции	Не требует специальных экспериментов; достаточно сравнить хроматограммы для одного и того же раствора до и после обработки ультразвуком.	Встречается редко.

Таблица 3.

Основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие испытания

№	Основные задачи стрессовых экспериментов	Стрессовые эксперименты (испытания)							Примечание
		1	2	3	4	5	6	7	
1	Определение потенциально возможных примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных и вспомогательных веществ.	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Используется главным образом для разработки и валидации аналитических методик. При обработке хроматограмм после любых стрессовых экспериментов необходимо оценивать спектральную чистоту пиков основных веществ и примесей, для которых необходимо использовать поправочные коэффициенты.
2	Разработка методик приготовления растворов для проверки пригодности хроматографической системы по показателю «Разрешение» (Resolution).	Да	Да	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Подбирают условия получения пика примеси – продукта деструкции, который наиболее близко расположен к пику основного вещества среди учитываемых примесей (обычно больших, чем 0,05%) и имеет достаточно высокий пик. Для этой цели лучше всего подходит гидролиз, однако на практике чаще всего используют окисление раствором перекиси водорода.
3	Исследование совместимости лекарственных и вспомогательных веществ.	Да/ Нет	Да/ Нет	Нет/ Да	Нет/ Да	Да	Нет	Нет	Испытание в климатической камере (при температуре выше температуры ускоренного хранения и относительной влажности 75%) имеет решающее преимущество перед другими стрессовыми экспериментами.
4	Экспресс-оценка стабильности лекарственных препаратов и субстанций.	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Нет	Для выбора подходящих вспомогательных веществ и упаковок. Для прогноза стабильности препаратов и субстанций.
5	Исследование воздействия ультразвука при приготовлении испытуемых растворов.	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Используется при разработке аналитических методик.
6	Исследование фотостабильности.	-	-	-	-	-	-	-	Испытание фотостабильности проводят в соответствии с требованиями ICH [4].

**Примечание:** **1** – Кислотный гидролиз (обычно в 1 М HCl); **2** – Щелочной гидролиз (обычно в 1 М NaOH); **3** – Окисление (чаще всего растворами перекиси водорода); **4** – Нагревание при повышенной температуре, как правило, с добавлением небольшого количества воды (гидролиз водой и термоокислительная деструкция кислородом воздуха); **5** – Нагревание в климатической камере при температуре выше температуры ускоренного хранения и относительной влажности 75%; **6** – Обработка ультразвуком; **7** – Энергичное растирание в фарфоровой ступке или в мельнице. **Да/Нет** – чаще «Да», чем «Нет»; **Нет/Да** – чаще «Нет», чем «Да».

## ПРОВЕДЕНИЕ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В таблице 3 рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие испытания. Рассмотрим эти испытания более подробно.

### Кислотный гидролиз

Применяется для оценки устойчивости веществ и смесей к действию кислой среды, а также для определения пиков потенциальных продуктов кислотного гидролиза лекарственных веществ. С химической точки зрения гидролиз представляет собой реакцию взаимодействия молекул вещества с молекулами воды, приводящую чаще всего к замещению функциональных групп на ОН-группы, а иногда, например в случае эфиров, – к отщеплению фрагментов молекул. Обычно скорость гидролиза невелика, особенно в нейтральной среде – при рН, близком к 7. Для того чтобы ускорить гидролиз, в стрессовых экспериментах используют нагревание веществ и смесей в присутствии небольших количеств воды (моделирование действия остаточной влаги) или паров воды, реже применяют нагревание растворов. Используют также более сильное стрессовое воздействие – ускорение реакций гидролиза в кислой или в щелочной среде за счет катализа ионами  $H^+$  ( $H_3O^+$ ) или  $OH^-$ .

Для проведения кислотного гидролиза при стрессовых экспериментах применяют, как правило, растворы  $HCl$  подходящей концентрации – обычно 1М  $HCl$ . При этом в зависимости от устойчивости молекул веществ к гидролизу можно использовать нагревание, комнатную температуру или охлаждение, меньшую концентрацию кислоты, меньшее время воздействия с целью замедлить скорость гидролиза и выполнить требования правила 1, приведенного выше. Растворы, получаемые при кислотном гидролизе, рекомендуются доводить до нейтральной среды добавлением небольшого объема раствора щелочи с целью предотвращения преждевременного снижения эффективности хроматографической колонки из-за инъекций сильнокислого раствора.

*Пример для трудногидролизуемой субстанции.* Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и выдерживают в течение 2 ч при температуре 80 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Нейтрализуют полученный раствор с помощью 1 М раствора гидроксида натрия до рН, близкого к 7.

### Щелочной гидролиз

О щелочном гидролизе можно написать то же самое, что отмечено выше для кислотного гидролиза, но только в отношении щелочной среды и с учетом замены  $HCl$  на  $NaOH$ .

### Окисление

Основная задача стрессовых экспериментов окисления – определить хроматографические пики примесей, которые потенциально могут образовываться из-за окисления лекарственных веществ в ходе технологических процессов или при хранении лекарственных веществ и препаратов; задачей таких экспериментов может быть также установление связи между изменением окраски веществ и их окислением. Очевидно, что основным окислителем, влияющим на образование примесей в лекарственных веществах и препаратах, является кислород воздуха. Тем не менее в стрессовых экспериментах окисления кислород обычно не используют в связи с высокой взрывопожароопасностью при нагревании веществ в атмосфере кислорода. Применяют, как правило, перекись водорода и ее водные растворы. Такой выбор объясняется тем, что перекись водорода легко разлагается и не вызывает в отличие от других окислителей дополнительных трудностей очистки растворов перед хроматографическим анализом. В качестве исходного окислителя рекомендуется использовать 3% раствор перекиси водорода. Однако из-за того, что молекулы веществ могут сильно различаться по способности к окислению, на практике приходится экспериментально подбирать концентрацию перекиси водорода, способ приготовления раствора для стрессовых экспериментов и условия их проведения.

Механизм процессов окисления – это радикальные реакции; они имеют, как правило, очень низкие энергии активации. Поэтому при стрессовом окислении веществ могут образовываться многочисленные продукты вторичных реакций, которые невозможны в технологических условиях и при хранении лекарственных веществ и препаратов. Очевидно, что такие вторичные реакции надо свести к минимуму. Возникает вопрос: как это сделать? Теоретически обоснованного ответа в настоящее время не существует. Однако можно основываться на практических результатах исследований. Установлено, что вторичные реакции проявляются в большом количестве пиков продуктов окисления на хроматограммах растворов после стрессовых испытаний. Следовательно, необходимо свести к минимуму количество таких пиков. Для этого по нашему опыту *при стрессовых экспериментах окисления необходимо обеспечить такие условия (концентрация окислителя, температура и продолжительность воздействия), чтобы разложение лекарственного вещества не превышало 5%, причем в большинстве случаев достаточно провести разложение вещества на 2–3%. Степень разложения лекарственных веществ можно легко контролировать по хроматограммам методом нормализации площадей пиков.*

Для веществ, способных к легкому окислению, рекомендуется использовать концентрацию перекиси водорода <3%, например 0,3% [23], окисление проводить при комнатной температуре или даже охлаждать

раствор. Для замедления окисления веществ целесообразно готовить испытуемый образец следующим образом. К точной навеске вещества добавлять определенный объем раствора перекиси водорода, а по окончании стрессовых экспериментов проводить необходимые разведения.

Нагревание резко ускоряет разложение перекиси водорода и протекание вторичных реакций. Поэтому в стрессовых экспериментах окисления, направленных на определение потенциально возможных примесей – продуктов разложения лекарственного вещества, редко используют нагревание выше 50 °С [24, 25]. Исключения составляют трудно окисляющиеся вещества. Отметим, что имеются некоторые ограничения использования перекиси водорода для стрессовых экспериментов окисления [24]; среди них можно выделить образование гидроперекиси при окислении ацетонитрила в щелочной среде с последующими реакциями гидроксигирования, не свойственными перекиси водорода. Хотя эти ограничения редко встречаются на практике, о них лучше знать заранее.

*Пример.* Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл 3% раствора перекиси водорода и выдерживают в течение 1 ч при 50 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

### **Приготовление растворов для проверки пригодности хроматографической системы (ППХС)**

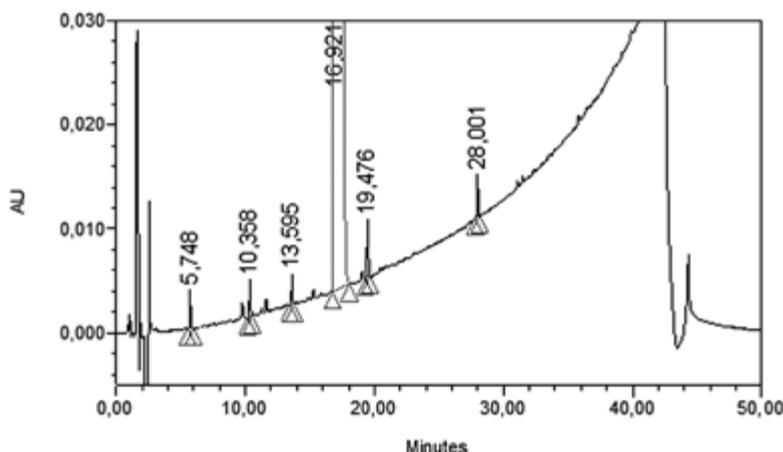
При использовании стрессовых экспериментов для приготовления растворов ППХС лучше всего применять гидролиз лекарственных веществ в кислой или щелочной среде. В этом случае образуется сравнительно небольшое количество примесей, как правило, достаточно хорошо разделенных, высота и площадь пиков которых хорошо воспроизводятся. Однако при гидролизе сравнительно редко удается получить пик примеси, расположенный «достаточно близко» к пику основного вещества: в общем случае рекомендуется, чтобы разрешение  $R_s$  между пиком лекарственного вещества и пиком, используемым для оценки пригодности хроматографической системы, было бы  $\leq 5$  [21, 26]. Напротив, при окислении раствора лекарственного вещества перекисью водорода часто удается среди многих пиков продуктов окисления выделить пик, который расположен достаточно близко к пику основного вещества. Поэтому окисление перекисью водорода является наиболее часто используемым стрессовым экспериментом для получения растворов ППХС. Его недостатком является варьирование высот пиков продуктов окисления от опыта к опыту. В связи с этим при выборе пика для проверки пригодности хроматографической системы надо тщательно проверять, что этот пик хорошо воспроизводится, а его высота достаточно

большая для надежной идентификации и определения значения  $R_s$ .

Следует подчеркнуть, что рекомендация использовать значения  $R_s \leq 5$  в требованиях к пригодности хроматографической системы была справедлива раньше как с теоретической, так и с практической точки зрения, поскольку свойства сорбентов, как правило, варьировались от партии к партии и не для всех методик при валидации проводились стрессовые эксперименты. В настоящее время сорбенты ведущих производителей практически не отличаются по свойствам от партии к партии, стрессовые эксперименты, как правило, стали проводить при валидации. В связи с этим приемлемым стало использование значений  $R_s > 5$ , если выполнены определенные условия. Во-первых, если в аналитической методике указана конкретная хроматографическая колонка (например, Symmetry C18 150×3,9 мм, 5 мкм, фирмы Waters), дающая однозначное указание на сорбент, и только такая колонка должна применяться при контроле качества. Во-вторых, в валидационной документации должно быть доказано, что примесь, для пика которой нормируется разрешение  $R_s$  с пиком основного вещества, является наиболее близкой к нему из учитываемых примесей (обычно более 0,05%); этот вывод должен быть подтвержден результатами, полученными в ходе исследования стабильности субстанций/препаратов и стрессовых экспериментов.

Характерно, что при использовании перекиси водорода для приготовления раствора ППХС мы столкнулись с проблемой, которая оказалась неожиданной, но очень важной с практической точки зрения. Во время трансфера методики контроля качества препарата нам сообщили, что на хроматограммах раствора ППХС, полученных в лаборатории ОКК, наблюдается слишком маленький пик примеси, предназначенный для оценки  $R_s$ , причем эти результаты подтверждаются по процедуре Out of Specification. В ходе расследования оказалось, что причиной было частичное разложение концентрированной перекиси водорода во время хранения (срок годности перекиси водорода в производственной таре не превышает 6 мес. с даты производства). Поэтому при разработке и применении растворов ППХС, основанных на использовании перекиси водорода, настоятельно рекомендуется: а) проверять пригодность растворов ППХС, получаемых при использовании перекиси водорода с остаточным сроком годности менее 1 мес.; б) брать для приготовления раствора ППХС только перекись водорода из заводской упаковки.

*Пример для трудно окисляющегося лекарственного вещества.* Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1 мл 3% раствора перекиси водорода, выдерживают в течение 30 мин при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до мет-



**Рисунок 1.** Хроматограмма раствора субстанции лекарственного вещества после нагревания в течение 30 мин при 60 °С в присутствии 3% перекиси водорода

	Name	Retention Time (RT)	RRT	Area	% Area	Height	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Impurity 1	5,748	0,34	18194	0,07	2481		0,96	12637	26,232	74,079
2	Peak 2	10,358	0,61	17800	0,07	2377	23,85	1,01	44615	22,479	56,784
3	Peak 3	13,595	0,80	12781	0,05	1742	16,54	1,14	76443	26,601	81,363
4	Drug	16,921	1,00	25465326	99,59	1047172	7,70	4,26	8131	0,258	0,379
5	Peak 5	19,476	1,15	35980	0,14	4471	5,32	1,02	134295	10,898	21,443
6	Peak 6	28,001	1,65	21085	0,08	2910	42,47	0,93	334481	20,941	38,690

**Примечание.** Impurity 1 – идентифицированная примесь. Retention Time – время удерживания, RRT – относительное время удерживания, Area – площадь пика, %Area – процентное содержание (по методу внутренней нормализации площадей пиков), Height – высота пика, Resolution – разрешение с предыдущим пиком, USP Tailing ( $T_{0,05}$ ) – фактор асимметрии пика, USP Plate Count – количество теоретических тарелок. Пики лекарственного вещества, примеси сравнения (RRT=1,15) и идентифицируемой примеси (RRT=0,34) спектрально чистые, так как Purity1 Angle < Purity1 Threshold

ки и перемешивают (раствор ППХС). Хроматограмма этого раствора приведена на рисунке 1. В результате стрессового эксперимента окисления образуется пик примеси с  $RRT \approx 1,15$ , который расположен достаточно близко к пику основного вещества ( $R_s = 5,3$ ) и достаточно высок для обнаружения. Следовательно, этот пик может быть использован для нормирования  $R_s$  (разделяющей способности) в требованиях к пригодности хроматографической системы<sup>1</sup>.

**Нагревание веществ и смесей при повышенной температуре в присутствии небольшого количества воды (гидролиз водой) и без воды**

Для исследования гидролиза водой рекомендуем следующий прием. Точную навеску субстанции лекарственного вещества, эквивалентную его содер-

жанию в навеске порошка для приготовления испытуемого раствора по методике определения примесей, помещают в мерную колбу, добавляют из пипетки небольшое количество воды (обычно 1 мл), нагревают в сушильном шкафу при контролируемой температуре в течение определенного времени, колбу с веществом охлаждают до комнатной температуры, затем проводят разведения до концентрации испытуемого раствора по методике определения примесей и анализируют хроматографическим методом. Результаты таких стрессовых экспериментов используют чаще всего при разработке и валидации аналитических методик, а также для оценки совместимости лекарственных и вспомогательных веществ. Иногда такие стрессовые эксперименты применяют для оценки возможности гидролиза и/или окисления лекарственного вещества кислородом воздуха при повышенной температуре в ходе технологического процесса.

<sup>1</sup> Для приготовления растворов ППХС иногда используют химическую модификацию лекарственных веществ путем взаимодействия с реагентами, такими как бром, иод, формальдегид и т.д. При этом получают вещества, очень близкие по химической структуре и по значениям RT к лекарственному веществу.

*Пример 1.* Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл воды и выдерживают в течение 24 ч при температуре 80 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

*Пример 2.* То же самое, но без добавления воды.

## Исследование веществ и смесей в климатической камере при повышенной температуре и влажности

Эти стрессовые эксперименты имеют несомненные преимущества перед другими стрессовыми экспериментами при прогнозе стабильности лекарственных препаратов и субстанций. Испытания твердых лекарственных форм рекомендуется проводить при температуре 60 °С и относительной влажности  $W=75\%$ . Увеличение температуры на 20 °С по сравнению с регламентированной температурой ускоренного хранения (40 °С) дает возможность быстрее (теоретически в 6 раз) установить негативные эффекты, которые могут протекать при хранении лекарственных веществ и препаратов (такие как увеличение содержания примесей – продуктов разложения основного вещества, уменьшение содержания основного вещества, изменение окраски и т.д.). Более высокую температуру используют редко, поскольку с повышением температуры значительно возрастает риск некорректного прогноза из-за того, что при высокой температуре скоростьопределяющими процессами могут стать процессы с высокой энергией активации,

которые не проявляют себя при обычной температуре хранения.

Подчеркнем, что для прогноза стабильности лекарственных препаратов и субстанций стрессовые эксперименты в климатической камере не могут быть заменены никакими другими стрессовыми экспериментами (см. ниже обсуждение результатов таблицы 5). Продолжительность таких стрессовых экспериментов в климатической камере можно легко определить в зависимости от температуры ( $t_{ST}$ ) по таблице эквивалентных температур, приведенной в ГФ XIII (раздел «Сроки годности лекарственных средств», таблица 3), или рассчитать в соответствии с уравнением Вант-Гоффа по формуле:

$$t_{ST} = t_0 / 2,5^{\frac{\Delta T}{10}},$$

где 2,5 – усредненное значение температурного коэффициента скорости реакции,  $\Delta T$  – разность температур стрессового эксперимента и долгосрочного испытания. Например, если стрессовые эксперименты проводят при 60 °С в климатической камере, а долгосрочные испытания – при 25 °С, то  $\Delta T=60-25=35$ . Тогда условному сроку хранения  $t_0=24$  мес. соответствует:  $t_{ST}=24/2,5^{3,5}=24/24,7=0,95$  мес. =  $0,95 \cdot 30=29,1 \approx 29$  дней; а значению  $t_0=12$  мес. –  $14,6 \approx 15$  дней.

В качестве важного примера кратковременных стрессовых испытаний в климатической камере в таблице 4 представлены экспериментально полученные сравнительные результаты анализа содержания основных примесей в таблетках препарата «БФ» трех

**Таблица 4.**

**Результаты краткосрочных стрессовых экспериментов с таблетками «БФ» разной дозировки в климатической камере при 60 °С и относительной влажности 75%**

Нормы	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 2,5 мг			Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг*			Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг*		
	Без стресса	2 суток	3 суток	Без стресса	2 суток	3 суток	Без стресса	2 суток	3 суток
Примесь А – не более 0,5%	0,01%	0,02%	0,03%	–	–	0,02%	–	–	0,02%
Примесь В – не более 0,5%	–	0,10%	0,17%	–	–	0,07%	–	–	0,03%
Примесь Е – не более 0,5%	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 0,5%	0,06%	0,15%	0,23%	0,03%	0,10%	0,17%	0,02%	0,04%	0,08%
Сумма примесей – не более 2,0%	0,26%	0,86%	1,30%	0,12%	0,55%	1,02%	0,05%	0,21%	0,53%

**Примечание:** \*Таблетки с дозировкой 5 и 10 мг получены из одной и той же таблеточной массы.

дозировок: исходных и подвергнутых стрессовому воздействию при температуре 60 °С и относительной влажности 75% в течение двух и трех суток. В ходе экспериментов было установлено, что скорость образования примесей зависит от соотношения «поверхность таблетки» / «объем таблетки», при этом она обратно пропорциональна дозировке препарата. Отметим, что это соотношение выполнялось практически абсолютно точно для таблеток дозировкой 5 и 10 мг, наработанных из одной и той же таблеточной массы. Полученные результаты указали на определяющую роль диффузионных процессов при действии паров воды и кислорода воздуха на скорость образования примесей при хранении таблеток «БФ». Этот вывод был также подтвержден результатами долгосрочных испытаний таблеток «БФ». Характерно, что аналогичная, обратно пропорциональная зависимость скорости образования (накопления) примесей от отношения поверхности к объему таблеток наблюдалась и для других препаратов, имеющих разные дозировки.

### **Исследование фотостабильности**

Условия стрессовых экспериментов по оценке фотостабильности достаточно подробно рассмотрены в руководстве ICH [4] и обзоре [6]. Кроме того, в книгах [1, 27] подробно обсуждены детали стрессовых экспериментов по определению фотостабильности и механизмы фотохимических процессов превращения лекарственных веществ. Имеющаяся в них информация достаточна не только с теоретической, но и с практической точки зрения. Отметим только наиболее важные требования [4, 6]: 1) образцы подвергают воздействию света, обеспечивающего освещение не менее 1,2 млн люкс/ч и суммарную энергию ультрафиолета ближнего спектра не менее 200 Вт·ч/м<sup>2</sup>; 2) твердые фармацевтические субстанции распределяют по контейнеру таким образом, чтобы толщина слоя не превышала 3 мм, а жидкие помещают в химически инертные прозрачные контейнеры.

### **Исследование возможности взаимодействия лекарственных веществ с реакционноспособными примесями из вспомогательных веществ**

В [28] рассмотрены основные реакционноспособные примеси (РСП) из вспомогательных веществ, которые потенциально могут влиять на стабильность лекарственных препаратов. К ним относятся пероксиды; сахара, обладающие восстановительными свойствами; муравьиную кислоту, формальдегид и т.д. Обычно содержание РСП пренебрежимо мало по сравнению с лекарственным веществом. Поэтому исследование возможности взаимодействия лекарственных веществ с РСП целесообразно проводить, только если все другие

стрессовые эксперименты не могут объяснить появление дополнительных пиков на хроматограммах испытуемых растворов при определении примесей в лекарственных препаратах.

### **Обработка ультразвуком**

Этот вид стрессовых экспериментов применяют для того, чтобы убедиться, что обработка ультразвуком испытуемого, а иногда и стандартного растворов не ведет к деструкции основного вещества и образованию примесей. Для этого обычно готовят раствор стандартного образца с концентрацией, равной номинальной концентрации основного вещества в испытуемом растворе, и/или испытуемый раствор. Затем отбирают часть стандартного/испытуемого раствора и подвергают его обработке ультразвуком, так как это делается по соответствующей аналитической методике; хроматографируют растворы до и после обработки ультразвуком и сравнивают средние значения аналитических сигналов (площадей пиков или оптических плотностей). В случае установления различия в средних значениях аналитических сигналов до и после обработки ультразвуком принимают решение об исключении обработки ультразвуком из аналитической методики и замене обработки ультразвуком, например, на встряхивание на шейкере, перемешивание в миксере и т.д.

### **Механохимическое воздействие**

Стрессовые эксперименты, моделирующие механохимическое воздействие, проводят при подозрении на то, что уменьшение содержания основного вещества и/или увеличение содержания примесей может происходить из-за механохимических реакций в ходе технологического процесса или при подготовке образцов для анализов с использованием растирания или размолла. Обычно возможность механохимических реакций проверяют путем растирания веществ и смесей в фарфоровой ступке или в мельнице. После стрессового воздействия полученные образцы анализируют обычным образом. О возможности протекания механохимических реакций делают вывод на основании сравнения пиков на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов: по появлению дополнительных пиков, уменьшению площади пика основного вещества, потере спектральной чистоты пика основного вещества и т.д.

## **ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**

Заключительным, важным этапом стрессовых экспериментов является оценка их результатов и составление выводов с обоснованиями и рекомендациями. В связи с этим предлагаем специальный подход, по-

Таблица 5.

**Типичные результаты стрессовых экспериментов для определения потенциально возможных примесей –  
продуктов разложения для разработки методики контроля качества одной из субстанций  
по показателю «Посторонние примеси»**

Наименование	Субстанция, не подвергнутая стрессовому эксперименту		Кислотный гидролиз 1М HCl, 80 °С, 1 ч		Щелочной гидролиз 1М NaOH, 50 °С, 2 ч		Окисление 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 °С, 3 ч		Термическое разложение в присутствии воды, 80 °С, 2 ч		Климатическая камера, тонкий слой порошка субстанции, 60 °С, W=75%, 3 дня		Воздействие света* 1,2 млн люкс/ч и 200 Вт·ч/м <sup>2</sup>	
	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area
Peak RRT 0,15 (blank)														
Peak RRT 0,19 (blank)														
Peak RRT 0,35							0,35	0,04						
Peak RRT 0,39							0,39	0,07						
Peak RRT 0,56							0,56	0,02						
Peak RRT 0,64							0,64	0,02						
Peak RRT 0,67							0,67	0,03						
Peak RRT 0,72	0,72	0,01	0,72	0,02	0,72	0,02	0,72	0,03	0,72	0,01	0,72	0,01	0,72	0,01
Peak RRT 0,79							0,79	0,06						
Peak RRT 0,83	0,83	0,01	0,82	0,01	0,82	0,01	0,83	0,03					0,83	0,01
Peak RRT 0,86							0,86	0,02						
Drug RRT 1,00	1,00	<b>99,81</b>	1,00	<b>99,79</b>	1,00	<b>98,25</b>	1,00	<b>99,21</b>	1,00	<b>98,30</b>	1,00	<b>98,37</b>	1,00	<b>99,80</b>
Peak RRT 1,20							1,20	<b>0,10</b>						
Peak RRT 1,84	1,84	0,02	1,85	0,02	1,85	0,02	1,84	0,04	1,85	0,02	1,84	0,02	1,84	0,02
Peak RRT 2,02	2,02	0,07	2,02	0,08	2,02	0,07	2,01	0,07	2,02	0,06	2,01	0,08	2,02	0,07
Peak RRT 2,14	2,14	0,04	2,15	0,03	2,15	0,05	2,14	0,03	2,15	0,03	2,14	0,04	2,14	0,04
Peak RRT 3,56	3,56	0,03	3,54	0,02	3,54	0,03	3,57	<b>0,11</b>	3,54	0,03	3,55	0,03	3,56	0,02
Peak RRT 3,75					3,75	<b>0,12</b>								
Peak RRT 5,22							5,22	0,02						
Peak RRT 5,76	5,76		5,77	0,02	5,74	<b>0,78</b>	5,78	0,00	5,76	<b>0,13</b>	5,76	<b>0,19</b>	5,76	
Peak RRT 5,94											5,94	<b>0,42</b>		
Peak RRT 6,16	6,16	0,01	6,12	0,01	6,19	<b>0,66</b>	6,16	0,07	6,16	<b>1,42</b>	6,16	<b>0,84</b>	6,16	0,01

**Примечание:** RRT – относительное время выхода пиков (относительное время удерживания);

% Area – процентное содержание вещества, вычисленное методом внутренней нормализации площадей пиков без поправочных коэффициентов.

\* Образцы подвергали воздействию света, обеспечивающего освещение 1,2 млн люкс/ч и суммарную энергию ультрафиолета ближнего спектра 200 Вт·ч/м<sup>2</sup>.

казавший высокую эффективность на практике. Известно, что при сопоставлении экспериментальных результатов, независимо от их природы, наибольшую информацию получают при использовании нормализованных показателей. Дело в том, что нормализованные показатели в отличие от абсолютных (к ним относится время выхода пика  $RT$ ) дают возможность абстрагироваться от несущественных явлений и воздействий, более четко видеть тенденции развития процессов. *В случае стрессовых экспериментов в качестве нормализованных показателей целесообразно использовать относительные времена выхода пиков (относительные времена удерживания) – RRT.* Значения RRT дают возможность корректно сопоставлять пики на хроматограммах, поскольку RRT пиков (в отличие от абсолютного показателя  $RT$ ) мало изменяются при практически неизбежном варьировании характеристик подвижной фазы в ходе стрессовых экспериментов. Это важно прежде всего для правильного отнесения («идентификации») пиков. В связи с этим в результатах обсчета хроматограмм в таблицах под рисунками хроматограмм следует обязательно приводить значения RRT наряду с временами выхода пиков. Могут спросить, а как быть в случае хроматограмм blank и плацебо, поскольку на них отсутствуют пики основных веществ и примесей, относительно которых можно вычислять значения RRT. Ответ простой: значения RRT системных пиков (blank) и пиков плацебо можно определять относительно времени выхода пика основного вещества на хроматограмме раствора сравнения или лучше, если нет «перегрузки» колонки, – относительно времени выхода пика основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора (так как пики примесей определяют и обсчитывают по этой хроматограмме).

Для установления негативных химических процессов, ответственных за образование примесей в лекарственных препаратах и субстанциях, а также для проверки возможности неправильного отнесения (идентификации) пиков примесей *большую эффективность показала систематизация результатов стрессовых экспериментов в форме специальных таблиц со значениями RRT, полученными при всех стрессовых экспериментах.* В качестве примера можно привести один из наиболее простых вариантов систематизации результатов стрессовых экспериментов, представленный в таблице 5. В ней приводятся данные для всех пиков на хроматограммах растворов лекарственного вещества до и после стрессовых экспериментов. В каждой строке указывается наименование пика, его значение RRT, а также содержание в %<sup>1</sup>, рассчитанное методом нормализации площадей/высот пиков. Столбцы представляют собой результа-

ты обсчета хроматограмм, а именно значения RRT и Area (в %) для выяснения, площади каких пиков увеличились и на сколько процентов после стрессового воздействия. На основании такой таблицы можно надежно установить возможность перекрытия пиков примесей, что чрезвычайно важно для разработки и валидации аналитических методик (особенно в случае наличия примесей, для которых необходимо определять поправочные коэффициенты, а также лекарственных форм, содержащих два и более лекарственных вещества). Кроме того, с помощью подобной таблицы можно соотнести образование определенных примесей с химическими процессами; сообщить технологам о вспомогательных веществах, от которых лучше отказаться; дать предложения о предпочтительной упаковке и т.д. Заметим, что иногда, в случае очень близко расположенных пиков, для их правильного отнесения можно, помимо значений RRT, использовать сравнение спектров с помощью диодно-матричного детектора и указывать это в нормативной документации.

Перейдем к более подробному рассмотрению таблицы 5, систематизирующей результаты стрессовых экспериментов. Эти эксперименты проводили в связи с разработкой методики ВЭЖХ для контроля содержания примесей в субстанции лекарственного вещества. Из таблицы видно, что пики основного вещества, примесей и blank не перекрываются. Субстанция фотостабильна (нечувствительна к воздействию света). Основные примеси в субстанции могут образовываться из-за щелочного гидролиза: пики с RRT=5,76 (0,78%), 6,16 (0,66%) и 3,75 (0,12%); окисления: пики с RRT≈1,20 (0,10%) и 3,56 (0,11%); термического разложения в присутствии воды: пики с RRT=5,76 (0,13%) и 6,16 (1,72%). Кроме того, при стрессовом эксперименте в климатической камере установлено, что при длительном воздействии паров воды (60 °C, W=75%, 3 дня) дополнительно появляется пик примеси с RRT=5,94, который, как оказалась, является продуктом разложения примеси с RRT=6,16. Важно отметить, что эта примесь не была обнаружена в других стрессовых экспериментах, но оказалась одной из основных при исследовании стабильности испытуемой субстанции в условиях естественного хранения по ICH: 25 °C, W=60%, 2 года. *Это указывает на важность проведения стрессовых экспериментов в климатической камере при повышенных температуре и влажности не только для экспрессной оценки стабильности лекарственных веществ и препаратов, но и при разработке аналитических методик, а также при исследовании совместимости лекарственных и вспомогательных веществ.*

<sup>1</sup> Для пиков blank и плацебо (в случае препаратов) не указывается содержание в %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен обзор публикаций по стрессовым экспериментам, представляющих наибольший интерес с практической точки зрения. Обсуждены основные компьютерные программы, дающие возможность прогнозировать механизмы превращения лекарственных веществ и образования примесей, а также облегчающие идентификацию примесей методами масс-спектрометрии и ЯМР.

Подробно рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие им испытания, в том числе стрессовые эксперименты для приготовления растворов для проверки пригодности хроматографических систем.

Приведены основные правила, выполнение которых обязательно для корректной оценки результатов стрессовых экспериментов. 1) Стрессовые эксперименты должны проводиться таким образом, чтобы свести к минимуму образование примесей вследствие вторичных реакций. Для этого разложение (превращение) основного вещества не должно превышать 5% при стрессовых экспериментах с окислением и 20% – в остальных случаях. 2) Надо стремиться к тому, чтобы растворы до и после стрессовых экспериментов имели близкие концентрации основного вещества. 3) На хроматограммах растворов после стрессовых экспериментов следует обязательно контролировать (определять) спектральную чистоту пиков основных веществ, а также пиков примесей, для которых требуется использовать поправочные коэффициенты.

Предложен подход для систематизации и анализа результатов стрессовых экспериментов, основанный на использовании относительных времен выхода пиков веществ и специальной таблицы. Он дает возможность надежно устанавливать перекрытие пиков веществ и тем самым оценивать валидность аналитических методик и необходимость их доработки. Этот подход будет полезен не только при разработке и валидации аналитических методик, но и при экспертной оценке соответствующих разделов документации на лекарственные вещества и препараты. В качестве примера использования предлагаемого подхода рассмотрена специальная таблица сравнения результатов до и после стрессовых экспериментов, которая дает возможность надежно выявлять перекрывающиеся пики веществ на хроматограммах. Кроме того, она дает возможность соотнести пики примесей с определенными негативными химическими реакциями разложения/превращения лекарственных веществ (кислотный или щелочной гидролиз, окисление, термическое разложение в присутствии небольших количеств воды или под действием паров воды, термоокислительная деструкция и т.д.). Зная возможные негативные хими-

ческие реакции, можно корректировать состав лекарственных форм, условия технологических процессов, упаковку и т.д.

Показано, что стрессовые эксперименты в климатической камере являются наиболее точными при прогнозе стабильности: их нельзя заменить другими стрессовыми экспериментами без риска пропустить примеси, которые могут накапливаться в ходе долгосрочного хранения препаратов, их полупродуктов и субстанций.

Наглядно объяснено, с использованием результатов таблицы 4, почему при хранении разных дозировок одного и того же препарата в одинаковых условиях часто наблюдается значительно большее содержание примесей в меньшей дозировке.

Даны рекомендации по проведению стрессовых экспериментов, которые, несомненно, будут полезны на практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. 2nd ed. / Ed. by S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed. – N.Y.: Informa healthcare, 2011. 612 p.
2. Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html> (дата обращения 15.06.2016).
3. Stability Testing of Existing Active Ingredients and Related Finished Products (CPMP/QWP/122/02 Rev. 1 corr). EMEA. URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003466.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003466.pdf) (дата обращения 15.06.2016).
4. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf) (дата обращения 15.06.2016).
5. Изучение стабильности и установление сроков годности лекарственных средств // Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Т. 2. – М.: Гриф и К, 2014. С. 224–268.
6. Л.И. Митькина, Е.Л. Ковалева, И.А. Прокопов. Стресс-исследования и фотостабильность как

- часть данных по фармацевтической разработке лекарственного средства // Ведомости НЦЭСМП. 2015. № 2. С. 9–12.
7. A. Paola Cione, E. Tonhi, P. Silva. Stability Indicating Methods // Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas / Ed. by Yukihiko Shoyama. – INTECH. 2011. 282 p. URL: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/23465/InTech-Stability\\_indicating\\_methods.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/23465/InTech-Stability_indicating_methods.pdf) (дата обращения 15.06.2016).
  8. J. Ruan. Approaches to Oxidative Forced Degradation of API and their Prediction for Stability Studies. Bristol-Myers Squibb. URL: [https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjdxLfrLPLAhWiApoKHcJSDocQFggbMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.yumpu.com%2Fen%2Fdocument%2Fview%2F31342568%2Fapproaches-to-oxidative-forced-degradation-of-api-and-their-&usq=AFQjCNF2q5\\_w2gr3PIT2YvjDAPDcUD1jSA&bvm=bv.116573086,bs.2,d.bGQ](https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjdxLfrLPLAhWiApoKHcJSDocQFggbMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.yumpu.com%2Fen%2Fdocument%2Fview%2F31342568%2Fapproaches-to-oxidative-forced-degradation-of-api-and-their-&usq=AFQjCNF2q5_w2gr3PIT2YvjDAPDcUD1jSA&bvm=bv.116573086,bs.2,d.bGQ) (дата обращения 15.06.2016).
  9. S.W. Baertschi. Patterns and Pathways: Using Chemistry to Guide the Characterization of Degradation Products. – Boston, MA: COSMOS. 2009. URL: <http://www.cosmoscience.org/archives/2009/Speaker%201-Patterns%20and%20pathways.pdf> (дата обращения 15.06.2016).
  10. Cambridge Soft Pharmaceutical Drug Degradation Database, Pharma D3. 2016 Arxspan. URL: <https://www.google.ru/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#newwindow=1&q=pharma+d3+drug+degradation+database; http://d3.arxspan.com/> (дата обращения 15.06.2016).
  11. Zeneth Chemical Degradation Prediction Software. URL: <http://www.lhasalimited.org/products/zeneth.htm> (дата обращения 15.06.2016).
  12. S. Görög. Identification and Determination of Impurities // Drugs Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. V. 4. 748 p.
  13. D. Jain, P.K. Basniwal. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2013. V. 86. P. 11–35.
  14. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances. ICH. 2006.
  15. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3B(R2). Impurities in New Drug Products. ICH. 2006.
  16. S.I. Farag Badawy, M.A. Hussain. Microenvironmental pH Modulation in Solid Dosage Forms // J. Pharm. Sci. 2007. V. 96. № 5. P. 948–959.
  17. S.R. Byrna, W. Xub, A.W. Newmanc. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications // Advanced Drug Delivery Reviews. 2001. V. 48. P. 115–136.
  18. S.S. Bharate, S.B. Bharate, A.N. Bajajc. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review // J. Excipients and Food Chem. 2010. V. 1. № 3. P. 3–26.
  19. Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова. Исследование взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ в твёрдых лекарственных формах // Химико-фармацевтический журнал. 1995. Т. 29. № 3. С. 47–50.
  20. У. Уэндландт. Термические методы анализа / Пер. с англ. под ред. В. А. Степанова и В. А. Берштейна. – М.: Мир, 1978. 526 с.
  21. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7<sup>th</sup> Ed. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30.
  22. European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> ed. 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques. 2015.
  23. U. A. Deokate, A. M. Gorde. Forced Degradation and Stability Testing: Strategies and Analytical perspectives. URL: <http://www.pharmachitchat.com/forced-degradation-and-stability-testing-strategies-and-analytical-perspectives/> (дата обращения 15.06.2016).
  24. E. Nelson. Kick-Start the Evolution of Stability Indicating Methods with Forced Degradation. – Transform. 2008. URL: [http://www.iirusa.com/upload/wysiwyg/2010-P-Div/P1511/Documentation/IIR\\_P1303\\_Nelson.pdf](http://www.iirusa.com/upload/wysiwyg/2010-P-Div/P1511/Documentation/IIR_P1303_Nelson.pdf) (дата обращения 15.06.2016).
  25. K.M. Alsante, L. Martin, S. W. Baertschi. A Stress Testing Benchmarking Study // Pharm. Tech. 2003. V. 27. № 2. P. 60–72. URL: [http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco\\_images/pharma/2014/08/22/d7d074db-6cd2-41af-9007-bc42c9b355f5/article-47384.pdf](http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/d7d074db-6cd2-41af-9007-bc42c9b355f5/article-47384.pdf) (дата обращения 15.06.2016).
  26. Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 11. С. 34–40.
  27. Photostability of Drugs and Drug Formulations // Ed. by H.H. Tonnesen. – Boca Raton – London – New York – Washington: CRC Press, 2004. 413 p.
  28. Y. Wu, J. Levons, A.S. Narang et al. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug-Excipient Incompatibility // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2011. V. 12. № 4. P. 1248–1263. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225520/> (дата обращения 15.06.2016).