DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-47-54
© Н. А. Эпштейн, 2020

*Н. А. Эпштейн**

ТРЕБОВАНИЯ ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ ДЛЯ МЕТОДИК ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ: КОНТРОЛИРУЕМЫЕ ПАРАМЕТРЫ И ИХ РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ (ОБЗОР)

Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО “ИРВИН 2”, Россия, 115446, Москва, Коломенский проезд, 13А
* e-mail: naumepshtein@gmail.com

На результаты хроматографических анализов могут оказать воздействие различные факторы, связанные с хроматографической системой. Для того чтобы минимизировать риск критического влияния таких факторов на результаты анализов в методику, вводят требования к пригодности системы (SS). В обзоре рассмотрены хроматографические параметры для тестирования пригодности системы и их рекомендуемые значения. Особенностью этого обзора является то, что параметры разбиты на 5 групп в зависимости от цели их введения в требования пригодности системы; учитывается тип методики (изократическая или градиентная), назначение теста – определение содержания основного вещества или примесей, асимметрия пиков и т.д.; рассмотрены некоторые дополнительные внутрилабораторные параметры для тестирования SS, используемые при серийных анализах. Впервые для градиентных методик определения примесей дана рекомендация вводить в пригодность системы условие $N \geq 0{,}9N_{exp}$, где N_{exp} – наименьшее экспериментальное значение N, при котором еще выполнялось требование к чувствительности системы S/N во время анализов до и при валидации методики. Это условие обосновано с теоретической точки зрения. Обращено внимание на целесообразность исследования робастности методик для уточнения требований пригодности системы. Сведения, приведенные в статье, существенно дополняют рекомендации Европейской фармакопеи, фармакопеи США и ГФ РФ по проверке пригодности хроматографических систем. Они важны для повышения надежности контроля пригодности хроматографической системы.

Ключевые слова: тестирование пригодности системы; требования; жидкостная хроматография; робастность.

Тестирование (проверка) пригодности системы (System suitability testing; SST) является обязательным условием при контроле качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов хроматографическими методами [1 – 7]. Оно обусловлено тем, что даже при выполнении условий хроматографирования на результаты анализов могут влиять различные факторы, связанные с хроматографической системой [1, 2, 8]. Для минимизации риска их критического влияния в методики вводят требования пригодности системы (SS, System suitability) – требования к определенным хроматографическим параметрам, к чувствительности хроматографической системы и т.д. [1 – 5, 7, 9 – 12]. Они являются важным дополнением к условиям хроматографирования, так как дают возможность использовать одну и ту же методику без ревалидации (дополнительной валидации) в разных лабораториях. При этом, если хотя бы одно из требований SS не выполняется, то результаты анализов считаются недостоверными.

Целью статьи являются вопросы, связанные с требованиями пригодности системы для методик жидкостной хроматографии с современных позиций, и рекомендации[1].

Прежде всего отметим, что тесты пригодности системы “используются для проверки того, что хроматографическая система является адекватной для предполагаемого анализа” [1]. Эти тесты “основываются на концепции, согласно которой оборудование, электроника, аналитические операции и анализируемые образцы составляют единую систему, которая может быть оценена по существу” [4].

В фармакопее США (USP) [1], Европейской фармакопее (EP) [2] и в ГФ XIV изд. [3] приведены общие сведения для оценки пригодности системы для хроматографических методик. В них указано только несколько рекомендаций по требованиям пригодности системы; их недостаточно на практике и, как будет показано ниже, могут оказаться необходимыми более жесткие или менее жесткие требования.

Отмечается [13], что “параметры, на основании которых делается вывод о пригодности или непригодности анализа, разделяются на 2 класса: касающихся от-

[1] В статье не рассматриваются требования пригодности системы (system suitability requirements) для биоаналитических методик.

дельных пиков и касающихся отношений между пиками". Однако такое разделение параметров не раскрывает сути требований SS. Для понимания сути требований SS целесообразно разделить параметры, используемые для контроля пригодности системы, на 5 групп в соответствии со следующими критериями.

1. Параметры для контроля необходимой разделяющей способности хроматографической системы.

2. Параметры формы пиков, которые должны обеспечить надежное определение точек начала и конца пиков, достаточное разделение пиков – для их воспроизводимого обсчета, а также необходимую чувствительность хроматографической системы.

3. Статистические параметры для контроля воспроизводимости площадей (высот) пиков, а также времени удерживания веществ в случае оценки подлинности соединений.

4. Параметры для контроля необходимой чувствительности хроматографической системы (для методик определения примесей).

5. Дополнительные внутрилабораторные параметры для контроля пригодности системы, используемые при серийных анализах.

Параметры первой группы должны контролировать необходимое разделение пиков определяемых веществ – для сохранения специфичности методики. Основной задачей параметров второй группы является обеспечение условий для достаточного разделения и воспроизводимого обсчета пиков (в том числе частично перекрывающихся). Задача параметров третьей группы – контроль необходимой прецизионности методик. Параметры четвертой группы предназначены для контроля чувствительности методик определения примесей. Параметры пятой группы предназначены для быстрого обнаружения возможных проблем с пригодностью системы при серийных анализах на производстве [6].

1. Параметры для контроля необходимой разделяющей способности хроматографической системы

Кажущийся коэффициент разделения соседних пиков R_s (разрешение, resolution). Это основной параметр для контроля разделяющей способности системы. Rs обычно вычисляют по формуле:

$$R_s = \frac{1{,}18(t_2 - t_1)}{W_{0,5(2)} + W_{0,5(1)}}, \qquad (1)$$

где t – время удерживания, $W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты, индексы 1 и 2 относятся к пикам 1 и 2 соответственно. Формула (1) обычно подразумевается по умолчанию. Если для определения R_s применяют другую формулу, то ее следует приводить в требованиях SS. Значение R_s определяют обычно между пиком основного (лекарственного) вещества и ближайшего к нему пика или/и между ближайшими пиками примесей надежно идентифицируемых на хроматограмме раствора для проверки SS (system suitability solution).

Вычисление разрешения R_s по формуле (1) с использованием ширины пика на половине его высоты обусловлено следующей причиной. Формула (1) дает возможность получать воспроизводимое значение R_s даже для пиков, которые разделены не полностью или имеют большие хвосты. Для таких пиков некорректно использовать ширину пика на уровне базовой линии или экстраполяцию ветвей пика к базовой линии для определения разрешения [12]. Альтернативой формуле (1) является использование ширины пика не на половине его высоты, а на меньшей высоте (H), например, 1/100 H, однако это потребует обоснования при валидации методики [12].

ЕР и ГФ XIV изд. рекомендуют использовать для SS требование $R_s \geq 1{,}5$. Практика подтвердила, что, если пики визуально симметричны или имеют небольшое перекрывание вблизи базовой линии, то достаточно ввести для SS требование $R_s \geq 1{,}5$ [5]. Однако, если пики значительно отличаются по высоте (ориентировочно более чем в 10 раз) или визуально перекрываются существенно выше базовой линии, то для SS надежнее использовать $R_s \geq 2{,}0$. Это должно обеспечить получение воспроизводимых значений площади (высоты) пиков, а также соответствует рекомендациям, приведенным в [10; 14, p. 543]. Такая ситуация наиболее часто встречается при хроматографировании растворов, содержащих лекарственные вещества с атомами азота, способными образовывать сильные водородные связи со свободными силанольными группами сорбентов.

На практике иногда вводят более жесткие требования к R_s. Например, в фармакопее США $R_s \geq 4$ для Oxycodone Hydrochloride, $R_s \geq 5$ для Olmesartan Medoxomil и даже $R_s \geq 10$ для Fexofenadine Hydrochloride [1]. В то же время в европейском руководстве по разработке монографий [11] отмечается неэффективность использования значений $R_s > 5$ в качестве критерия разделяющей способности хроматографической системы. В таких случаях предлагается "использовать другую примесь или другое вещество химически родственное к изучаемому веществу, дающее меньшее разрешение" [11].

Коэффициент p/v (отношение "пик – долина"; peak-to-valley ratio):

$$\frac{p}{v} = \frac{h_p}{h_v}, \qquad (2)$$

где h_p – высота меньшего из двух перекрывающихся пиков относительно экстраполированной базовой линии; h_v – высота низшей точки (седловины) кривой, разделяющей перекрывающиеся пики, относительно экстраполированной базовой линии [2, 3]. Этот параметр используют, если имеет место столь значительное перекрывание пиков, что для контроля их разрешения не годится R_s. Чаще всего это бывает тогда, когда пик примеси выходит на начальном участке фронта пика основного вещества.

Европейское руководство по разработке монографий [11] и ГФ XIV изд. [3] рекомендуют использовать коэффициент p/v вместо R_s, если $R_s < 1{,}5$. При этом минимальное требование к отношению peak-to-valley должно быть не меньше, чем 1,5, то есть $p/v \geq 1{,}5$ [11]. Это, по нашему опыту, обеспечивает получение воспроизводимого значения площади пика примеси: $RSD \leq 5{,}0$ %. Заметим, что наименьшее требование к p/v, которое встречалось в утвержденной валидационной документации, было $p/v \geq 1{,}2$. Однако оно может оказаться недостаточно надежным на практике.

Важно подчеркнуть, что для методик определения примесей допустимые значения R_s и p/v следует оценивать с учетом хроматограмм стрессовых исследований [15, 16], а более надежно – по результатам исследования робастности методики [17 – 22]. При этом часто не удается полностью разделить все пики примесей, однако, на практике в этом нет необходимости. Регламентируемое требование к R_s и/или к p/v должно обеспечить такое разделение пиков примесей между собой и с другими пиками, чтобы получались воспроизводимые значения площади (высоты) пиков примесей.

Для тестирования SS, как правило, указывают требование к R_s или к p/v для пиков основного вещества и ближайшей к нему примеси, а при необходимости еще и между наиболее близко расположенными пиками примесей. При этом между пиками, по которым определяется требование к R_s, не должно быть других пиков ("промежуточные пики"). В противном случае надо обосновывать необходимость и возможность игнорирования "промежуточных пиков".

При регламентировании R_s относительно пика основного вещества следует обращать внимание на концентрацию основного вещества в растворе для тестирования (проверки) SS. До сих пор встречаются методики, в которых требование к R_s контролируют по хроматограмме раствора сравнения, в котором концентрация основного вещества значительно меньше, чем в испытуемом растворе. Этого следует избегать, так как при увеличении концентрации основного вещества увеличиваются высота и ширина его пика. В связи с этим выполнение требования SS к R_s на хроматограмме такого раствора сравнения не может гарантировать отсутствие перекрывания пика основного вещества и ближайшей примеси на хроматограмме испытуемого раствора. Правильный выбор: в растворе для тестирования пригодности системы по R_s концентрация основного (лекарственного) вещества должна быть такой же, что и в испытуемом растворе.

Если "невозможно идентифицировать критическую пару соединений для определения разделения или если примеси нет в достаточном количестве, или она недоступна", то для приготовления раствора для тестирования (проверки) SS можно использовать стрессовое разложение АФИ [7, 16, 23].

Коэффициент емкости *k′*:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \qquad (3)$$

где t_R и t_0 – время удерживания рассматриваемого вещества и несорбируемого вещества соответственно. Коэффициент емкости можно условно рассматривать как дополнительную характеристику разделяющей способности хроматографической системы. С этой целью иногда вводят требование для определяемых веществ $k' > 2$ [10, 14, p. 543]. Оно минимизирует риск перекрывания пиков определяемых веществ с системными и другими пиками в мертвом объеме или в непосредственной близости от него.

Примечание 1. В настоящее время для SS перестали использовать такие параметры как селективность α и относительное время удерживания RRT [2].

Примечание 2. Значение R_s пропорционально корню квадратному от числа теоретических тарелок N и зависит от других параметров пика. Поэтому N не может использоваться как параметр для контроля разделяющей способности хроматографической системы вместо R_s [24].

2. Параметры формы пиков

Для получения корректных и воспроизводимых результатов анализа надо надежно определять точки начала и конца пиков, а также обеспечивать достаточное разделение пиков определяемых веществ [5]. Для этого пики должны быть достаточно узкими и не должны иметь очень длинных хвостов сзади (tailing) и/или спереди (fronting). Кроме того, узость пика важна для обеспечения необходимой чувствительность хроматографической системы – при одинаковой площади пика (одинаковой концентрации вещества C) высота пика тем больше, чем более узким является пик.

Так как tailing и fronting характеризуются фактором симметрии (асимметрии) пика A_s, а узость пика – числом теоретических тарелок N, то для тестирования пригодности хроматографической системы необходимо вводить требования к N и A_s.

Число теоретических тарелок *N* (эффективность хроматографической системы) вычисляется с использованием различных формул, пригодность которых зависит от формы пика [14]. Однако, если в методике не указано иное, обычно используют формулу [1 – 3]:

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{W_{0,5}}\right)^2, \qquad (4)$$

где t_R – время удерживания; $W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты.

В общем случае для SS рекомендуется $N > 2000$ [10, 14]. В соответствии связи с этим для тестирования SS чаще всего применяют требование $N \geq 2000$ для пика основного вещества на хроматограмме раствора сравнения (стандартного раствора).

Для градиентных методик определения примесей, как показали результаты, полученные при трансфере методик, для обеспечения необходимой чувствительности хроматографической системы может потребо-

[2] Раньше иногда использовали требование $\alpha \geq 1{,}05$ [Jenke D.].

ваться более жесткое условие: $N > 2000$. Это прежде всего относится к методикам, у которых на хроматограмме раствора для проверки чувствительности системы (sensitivity solution) экспериментальное значение отношения сигнал/шум базовой линии $S/N \approx 10$ или немного больше 10. Казалось бы, что в таких случаях для оценки SS достаточно использовать требование $N \geq N_{exp}$, где N_{exp} – наименьшее экспериментальное значение N, при котором выполнялось условие $S/N \geq 10$. Однако при эксплуатации колонки может происходить значительное уменьшение N из-за уширения пиков. Для оценки допустимого уменьшения N используем формулу (4), а также требование пригодности системы $S/N \geq 10$. Из формулы (4) следует, что при прочих равных условиях значение N обратно пропорционально квадрату ширины пика на половине его высоты $W_{0,5}$. Если представить пик как треугольник, его площадь S будет равна произведению высоты пика H на половину его ширины или $S = HW_{0,5}$. Так как значение S пропорционально (~) концентрации вещества, то при заданной концентрации вещества значение $S = \text{const}$ и, следовательно, $W_{0,5} \sim 1/H$. Подставив это выражение в (4), получаем при прочих равных условиях, что $N \sim H^2$. С другой стороны, для выполнения требования $S/N \geq 10$, наихудшим допустимым значением будет $S/N = 9,5$ – нижний предел, при котором округление даст $S/N = 10$. То есть можно допустить уменьшение высоты пика H в пределах $(10,0 – 9,5) \cdot 100/10 = 5$ % или до $0,95H$. Так как $H^2 \sim N$, то $(0,95H)^2 \sim 0,952N \approx 0,9N$. Следовательно, теоретически допустимо снижение N до $0,9N$. В связи с этим для градиентных методик определения примесей рекомендуем для тестирования пригодности системы вводить условие $N \geq 0,9N_{exp}$, где N_{exp} – наименьшее экспериментальное значение N, при котором еще выполнялось требование к чувствительности системы S/N во время анализов до и при валидации методики. Это, с одной стороны, даст возможность обосновывать значение N для SS, а с другой – повысит вероятность обеспечения необходимой чувствительности хроматографической системы.

Примечание. Для изократических методик определения содержания основных веществ можно использовать менее жесткое требование $N \geq 1000$ [5]. Это бывает важно, если невозможно обеспечить эффективность хроматографической системы $N \geq 2000$.

Таблица 1

Максимально допустимые значения относительного стандартного отклонения площадей (высот) пиков

B, % (верхний предел содержания основного вещества, указанный в фармакопейной статье, минус 100 %)	Количество повторных инжекций m			
	3	4	5	6
	Максимально допустимые значения относительного стандартного отклонения RSD_{max}, %			
1,0	0,21	0,30	0,37	0,42
1,5	0,31	0,44	0,55	0,64
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Фактор асимметрии (симметрии) пика – symmetry factor – вычисляют по формуле:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f}, \qquad (5)$$

где $W_{0,05}$ – ширина пика на уровне 5 % (1/20) его высоты; f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на уровне 5 % его высоты. Этот фактор иногда называют tailing factor [1] и обозначают как $T_{0,05}$. Для пика с растянутой фронтальной частью (fronting) $A_s < 1$, для симметричного пика $A_s = 1$, а для пика с хвостом (tailing) $A_s > 1$. Фармакопеи рекомендуют использовать значения A_s для растворов сравнения (стандартных растворов) в пределах от 0,8 до 1,5 [2, 3]. Эти значения A_s достаточны для надежного определения точек начала и конца пиков, и, как следствие, их площадей и высот. На практике для валидированных методик встречались требования к A_s с границами 0,75 и 2,5 [5]. Однако по опыту валидации методик не рекомендуем нормировать A_s вне диапазона 0,8 – 2,0 из-за большой неопределенности оценки точек начала и конца пиков.

3. Статистические параметры для контроля воспроизводимости площадей (высот) пиков, а также времени удерживания веществ

В математической статистике для оценки воспроизводимости результатов используют их стандартное отклонение SD и относительное стандартное отклонение *RSD* в %:

$$SD = \frac{\sqrt{\Sigma(Y_i - \overline{Y})^2}}{(n-1)}, \quad RSD = \frac{SD \cdot 100}{\overline{Y}}, \qquad (6)$$

где Y_i и $\overline{Y}$ – результаты определений площади (или высоты) пиков и их среднее значение, соответственно; n – количество определений. На практике для контроля SS используют только *RSD*. Это объясняется тем, что значения *SD* зависят от конкретных детекторов и изменяются при переходе от одного хроматографа к другому. Использование *RSD* – нормализованного значения *SD* – нивелирует влияние детекторов на оценку воспроизводимости результатов.

Для методик определения основных веществ фармакопеи [1 – 3] рекомендуют для тестирования SS использовать требование:

для лекарственных препаратов $RSD \leq 2,0$ % (методики разделов “Количественное определение”, “Однородность дозирования”, “Растворение”);

для фармацевтических субстанций $RSD \leq RSD_{max}$ из табл. 1.

Для методик определения примесей обычно используют требование $RSD \leq 5,0$ % [5, 6]; оно теоретически соответствует отношению сигнал/шум около 10, то есть пределу количественного определения LOQ [25].

Для тестов идентификации (подлинности) могут вводить требование к воспроизводимости времени

удерживания веществ [3]. Однако на практике это встречается очень редко. Иногда для изократических методик указывают требование к разнице между временем удерживания основного (лекарственного) вещества на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов, например, не больше 2,0 %.

4. Параметры для контроля необходимой чувствительности хроматографической системы (для методик определения примесей)

Раньше для контроля необходимой чувствительности хроматографической системы использовали значения предела обнаружения LOD или предела количественного определения LOQ [5, 9]. Однако их оценка трудоемка, а сами значения LOQ и LOD зависят от способа их определения и других факторов. Поэтому в настоящее время для обеспечения необходимой чувствительности системы контролируют не LOQ или LOD, а отношение высоты пика определяемой примеси или основного вещества, к половине размаха шума базовой линии. Это отношение называется "отношение сигнал/шум" (signal-to-noise ratio) и обозначается *S*/*N*. Согласно ГФ XIV изд. "отношение сигнал/шум для пика вещества, полученное для раствора с концентрацией, равной требуемому уровню минимально определяемой концентрации, должно быть не менее 10" [3]. При этом минимально определяемая концентрация должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit). Эти условия аналогичны приведенным в фармакопее США [1] и в Европейском руководстве по разработке монографий [11].

Параметр *S*/*N* обязательно контролируют для методик определения неидентифицированных примесей, а также идентифицированных примесей, определяемых с использованием поправочных коэффициентов. В отличие от этого, *S*/*N* редко контролируют для методик определения примесей с использованием их стандартов; исключение – высокотоксичные примеси. Для оценки *S*/*N* обычно готовят специальные растворы для проверки чувствительности хроматографической системы (sensitivity solution; SNS) с определенной концентрацией [25, 26].

Значение *S*/*N* вычисляют по формуле:

$$\frac{S}{N} = \frac{H}{\frac{h}{2}} = \frac{2H}{h}, \qquad (7)$$

где H – высота пика сновного вещества на хроматограмме раствора SNS, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии; h – размах фонового шума, измеряемый обычно на той же хроматограмме, если не указано иное (альтернатива: определение h на хроматограмме blank или раствора плацебо). Экстраполяцию базовой линии и измерение h проводят во временном интервале не меньше 5-кратного значения ширины пика на его полувысоте. Этот интервал, если это возможно, берут равномерно по обе стороны от пика основного вещества [1 – 3]. В случае шума высокой частоты (short-term noise) рекомендуется разбивать диапазон, в котором определяется шум, на сегменты по 0,5 – 1 мин и оценивать значение h на основании максимального размаха фонового шума на сегментах [7].

Вопросы, связанные с определением требования к отношению *S*/*N*, подробно рассмотрены в [25, 26]. Здесь отметим только основные моменты.

Концентрация раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (SNS) должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit), который обычно регламентируется в соответствии с порогом регистрации примесей (reporting threshold) [1, 3, 11]:

0,03 % – для субстанций при суточной дозе препарата > 2 г;

0,05 % – для субстанций при суточной дозе препарата ≤ 2 г и для препаратов при их суточной дозе > 1 г;

0,1 % – для препаратов при их суточной дозе ≤ 1 г.

Это типичные значения концентрации раствора SNS в % относительно концентрации испытуемого раствора для определения примесей. Например, при суточной дозе препарата > 1 г концентрацию раствора SNS рекомендуется брать 0,05 % от концентрации испытуемого раствора для определения примесей. Однако при определенных условиях могут быть необходимы более высокие или более низкие значения концентрации раствора SNS. Рассмотрены такие ситуации [25, 26].

В отдельных случаях нижняя граница требования к *S*/*N* может оказаться больше 10 [25]:

если имеются примеси с поправочными коэффициентами $F > 1{,}25$;

если время выхода последнего пика по результатам стрессовых исследований при валидации методики определения примесей или продолжительность хроматограммы испытуемого раствора значительно превышает время удерживания основного вещества (ориентировочно в 4 раза и более).

В очень редких случаях нижняя граница требования к *S*/*N* может оказаться меньше 10. Например, при определении содержания энантиомера, если пик основного вещества выходит после пика его энантиомера [26].

5. Дополнительные внутрилабораторные параметры для контроля пригодности системы, используемые при серийных анализах

При серийных анализах фармацевтических субстанций и препаратов на производстве важно быстро контролировать пригодность системы, а также определять потенциальные проблемы, которые могут проявиться в ближайшее время. С этой целью можно использовать визуальную оценку пригодности системы сравнением хроматограмм определенных растворов с эталонными хроматограммами по утвержденной схеме [6, 9]. "Эталонная (типичная) хроматограмма является либо образцом, который прикладывается к методике, либо хроматограммой, полученной во время последней проверки пригодности системы" [6]. При сравнении хроматограмм контролируют время удер-

Таблица 2

Параметры для контроля (тестирования) пригодности системы и их рекомендуемые значения

№	Параметр	Рекомендуемые значения	Примечание
Параметры для контроля необходимой разделяющей способности хроматографической системы			
1	Разрешение R_s	$R_s \geq 1{,}5$ [2, 3] для симметричных пиков и пиков с небольшим хвостом ($A_s \leq 1{,}5$). В остальных случаях $R_s \geq 2{,}0$ или больше	Если $R_s > 5$, то для тестирования пригодности системы предпочтительнее “использовать другую примесь или другое вещество, химически родственное изучаемому веществу, дающее меньшее разрешение” [11]. Между пиками, по которым определяется требование к R_s, не должно быть других пиков. В противном случае необходимо обосновать, что они не могут влиять на результаты анализов.
2	Коэффициент p/v	$p/v \geq 1{,}5$ [11, 2]	Коэффициент p/v рекомендуется использовать, если $R_s < 1{,}5$ [11, 2].
3	Коэффициент емкости k'	$k' > 2$ [10, 14]	Требование $k' > 2$ для определяемых веществ вводят для минимизации риска перекрывания их пиков с системными и другими пиками в мертвом объеме или в непосредственной близости от него.
Параметры формы пиков			
4	Число теоретических тарелок N	$N \geq 2000$ – используется наиболее часто. Для изократических методик определения содержания основных веществ достаточно $N \geq 1000$ [5].	Для градиентных методик определения примесей рекомендуем вводить требование $N \geq 0{,}9N_{exp}$, где N_{exp} – наименьшее экспериментальное значение N, при котором еще выполнялось требование к чувствительности системы S/N (signal-to-noise) во время анализов до и при валидации методики.
5	Фактор асимметрии пика A_s	A_s 0,8 – 1,5 [2, 3]. $A_s \leq 2{,}0$ – для пиков с большим хвостом [5].	Не рекомендуем нормировать A_s вне диапазона 0,8 – 2,0 из-за большой неопределенности оценки точек начала и конца пиков
Статистический параметр для контроля воспроизводимости площадей (высот) пиков			
6	Относительное стандартное отклонение RSD	$RSD \leq 2{,}0$ % – для методик определения содержания основных веществ в препаратах [1], $RSD \leq RSD_{max}$ в табл. 1 – для методик определении содержания основного вещества в фармацевтических субстанциях [1 – 3], $RSD \leq 5{,}0$ % – для методик определении примесей [5, 6].	$RSD \leq 2{,}0$ % для тестов “Количественное определение”, “Однородность дозирования”, “Растворение”. Для тестирования пригодности системы используют RSD площади (высоты) пика на хроматограмме стандартного раствора или раствора сравнения.
Параметр для контроля необходимой чувствительности хроматографической системы (для методик определения примесей)			
7	Отношение сигнал/шум базовой линии S/N для пика основного вещества на хроматограмме раствора для проверки чувствительности системы (sensitivity solution)	$S/N \geq 10$, однако нижняя граница этого требования при определенных ситуациях может быть больше и даже меньше 10.	При наличии в расчетной формуле поправочных коэффициентов $F > 1{,}25$ и/или поздно выходящих пиков примесей нижняя граница требования к S/N может превысить 10 [25]. В редких случаях нижняя граница требования к S/N может оказаться меньше 10: например, $S/N \geq 8$ при определении содержания энантиомера, когда пик основного вещества выходит после пика его энантиомера [26]. Концентрация раствора для проверки чувствительности хроматографической системы выбирается определенным образом (см. текст). Чаще всего она составляет 0,05 % от концентрации испытуемого раствора.
Некоторые дополнительные внутрилабораторные параметры для тестирования пригодности системы, используемые при серийных анализах			
8	Визуальное сравнение параметров получаемых хроматограмм и соответствующих им эталонных хроматограмм	–	Это эффективный способ быстрого обнаружения потенциальной проблемы в ходе серийных анализов.
9	Давление (P) в хроматографической системе во время хроматографирования	–	Максимально допустимое значение P_{max} на кривой давления при хроматографировании пробы или холостой инжекции (без пробы) должно быть таким, чтобы оператор мог заранее заметить потенциальную проблему и выполнить регламентированные действия.
10	Время удерживания основного вещества	± 10 % при изократическом режиме [7, с. 222]; ± 15 % при градиентном режиме [2].	–
11	Линейность калибровочного графика и незначимость его свободного члена (a)	Требование к коэффициенту линейной корреляции r – в соответствии с критерием приемлемости при валидации методики. Допустимое значение свободного члена $a \leq 3$ % или статистическая незначимость a [6]	Оценку линейности проводят только в случае использования калибровочного графика в методике [6].

Таблица 3

Типичные параметры, применяемые для оценки пригодности системы в зависимости от теста

Тест	Одно определяемое вещество	Несколько определяемых веществ
Количественное определение; Однородность дозирования; Растворение	Параметры из групп критериев 2 и 4: *N*, A_s и *RSD*	Параметры из групп критериев 1, 2 и 4: R_s, *N*, A_s и *RSD*
Родственные соединения (примеси)	-	Параметры из групп критериев 1, 2, 3 и 4: R_s, *N*, A_s, *RSD, S/N* и иногда *k'*
Подлинность (если применяется специальная методика)	Параметры из группы критериев 2: N, A_s	Параметры из группы критериев 2: *N*, A_s

живания веществ – для изократики обычно допускается отклонение не более ± 10 % [7, с. 222], для градиента не более ± 15 % [1, 2]; разделение критических пар пиков и симметрию пиков [6, 14].

Для контроля пригодности системы могут вводить максимально допустимое давление в системе, устанавливаемое по результатам записи давления в системе при анализах. Иногда используют оценку линейности калибровочного графика [6].

Сводные таблицы по параметрам пригодности системы и их рекомендуемым значениям

Требования пригодности системы могут зависеть от типа методики – изократическая или градиентная, теста – определение содержания основного вещества или примесей, асимметрии пиков и т.д. Это учтено в табл. 2, в которой приведены параметры для контроля (тестирования) пригодности системы и их рекомендуемые значения. На них целесообразно ориентироваться при разработке, трансфере и использовании методик жидкостной хроматографии. В табл. 3 указаны типичные параметры, применяемые для оценки пригодности системы в зависимости от теста.

Робастность методик

Для надежного определения или уточнения требований SS рекомендуется исследовать робастность аналитических методик [17 – 22]. Исследование робастности методик важно также для оценки допустимости небольших коррекций (изменений) условий хроматографирования. Несмотря на то, что в фармакопеях [1 – 3] даны рекомендации по допустимым коррекциям условий хроматографирования, наш опыт показал, что некоторые из этих рекомендаций могут оказаться непригодными прежде всего для методик определения примесей [27]. Подробно рассмотрены [28] допустимые коррекции (изменения) условий хроматографирования с точки зрения требований к ревалидации методик. В этом обзоре отмечены конкретные риски при использовании рекомендаций EP (ГФ XIV изд.) и USP по допустимым коррекциям условий хроматографирования; указаны необходимые действия для минимизации этих рисков.

Подробно рассмотрено исследование [8] робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ классическим способом (варьирование по одному фактору при постоянстве других) с анализом рисков. При этом показано, как определять факторы высокого и среднего риска, оценивать робастность методик относительно этих факторов и устанавливать критические факторы – те, которые могут критически влиять на результаты анализов и от которых зависит пригодность системы. Пошагово показано [17], как исследовать робастность хроматографических методик с использованием анализа рисков и математического планирования экспериментов; как определять допустимые коррекции (allowable adjustments) условий хроматографирования и требования пригодности системы.

Материалы для тестирования пригодности системы в лабораториях

Недавно были опубликованы рекомендации FDA (U. S. Food and Drug Administration) “What material can be used for system suitability?” [29]. В них сказано, что “FDA ожидает, что пригодность системы определяется с использованием квалифицированных первичных или вторичных стандартов и любых материалов, необходимых для обеспечения адекватного функционирования метода. Новая партия высокочистого стандартного материала (например, от поставщика химикатов или произведенного собственными силами) должна быть квалифицирована относительно первичного стандарта. Готовые лекарственные формы или АФИ, которые не были квалифицированы как стандарты сравнения, не должны использоваться для тестирования пригодности системы. Даже если АФИ или готовая лекарственная форма должным образом квалифицированы как стандарт сравнения, ее не следует использовать для тестирования пригодности системы, если она из той же партии, что и исследуемый образец (образцы)” [29].

Приведенные в этом обзоре сведения существенно дополняют рекомендации Европейской фармакопеи, фармакопеи США и ГФ XIV изд. по тестированию пригодности хроматографических систем. Они важны для повышения надежности контроля пригодности хроматографической системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *United States Pharmacopoeia*, Chromatography, USP40-NF35 (2017).
2. *European Pharmacopoeia*, 9.5th ed., Chapter 2.2.46, Chromatographic Separation Techniques, EDQM, Strasbourg (2018).
3. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIV изд., т. 1, Москва (2018), сс. 862 – 865.
4. *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH (2005); 13.

URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
5. Н. А. Эпштейн, С. В. Емшанова, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(11), 34 – 40 (2008).
6. *Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, В. В. Береговых (ред.), Литтерра, Москва (2008).
7. *Валидация методик в фармацевтическом анализе*, Йоахим Эрмер, Джон Х. МакБ. Миллер (ред.), Группа компаний ВИАЛЕК, Москва (2013).
8. Н. А. Эпштейн, В. Л. Севастьянова, А. И. Королева, *Разработка и регистрация лек. средств*, **7**(1), 96 – 110 (2018); URL: https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/552/0; перевод на англ. Epshtein N. A., Sevastianova V. L., Koroleva A. I. URL: https://www.researchgate.net/publication/323801207_INVESTIGATIONo._OF ROBUSTNESS_AT_VALIDATIONo._OF HPLC_AND_UPLC_METHODS_A_MODERNo._APPROACH INCLUDING_RISK_ANALYSIS/stats)
9. J. C. Wahlich, G. P. Carr, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**(8 – 12), 619 – 623 (1990); URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0731708590800913
10. *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington (1994); URL: https: // www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf
11. *Technical Guide for the Elaboration of Monographs*, 7th ed., EDQM, *European Pharmacopoeia* (2015), pp. 30 – 32; URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf
12. К. Сычев, *Аналитика*, **2**(3), 60 – 66 (2012); URL: http://www.j-analytics.ru/files/article_pdf/3/article_3204_700.pdf
13. П. С. Садек, *Как избежать ошибок в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Лабораторное пособие*, Пер. с англ. И. Дубинского, Москва (2010).
14. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Introduction to modern liquid chromatography*, 3d ed. Hoboken, John Wiley and Sons, New Jersey (2010).
15. *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug DegradationБ 2nd ed.*, S. W. Baertschi, K. M. Alsante, R. A. Reed (eds.), Infoorma_healthcare, N. Y. (2011).
16. Н. А. Эпштейн, *Разработка и регистрация лек. средств*, **3**(16), 118 – 132 (2018); URL: https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/298/294
17. Н. А. Эпштейн, *Разработка и регистрация лек. средств*, **3**(24), 116 – 128 (2018); URL: https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/612
18. D. R. Jenke, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **19**(12), 1873 – 1891 (1996); URL: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079608014012.
19. Y. Vander Heyden, M. Jimidar, E. Hund, et al., *J. Chromatography A.*, **845**, 145 – 154 (1999); URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967399003283.
20. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, et al., *J. Pharm. and Biomed. Analysis*, **24**(5 – 6), 723 – 753 (2001); URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073170850000529X
21. E. Hund, Y. Vander Heyden, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1197 – 1206 (2002); URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708502004703
22. P. K. Sahu, *J. Anal. Bioanal. Tech.*, **8**(3), 1 – 8 (2017); doi: https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000363.
23. Н. А. Эпштейн, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(3), 40 – 56 (2004).
24. J. W. Dolan, *Column Plate Number and System Suitability*, LC-GC North America, **34**(3), 190 – 197 (2016); URL: http://www.lcresources.com/tsbible/34032016.pdf
25. Н. А. Эпштейн, *Разработка и регистрация лек. средств*, **8**(1), 108 – 112 (2019); doi: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112.
26. Н. А. Эпштейн, *Ведомости НЦЭСМП*, **7**(2), 85 – 91 (2017); URL: https://www.vedomostincesmp.ru/jour/article/view/124?locale=ru RU
27. Н. А. Эпштейн, В. Л. Севастьянова, А. И. Королева, *Разработка и регистрация лек. средств*, **3**(24), 182 – 188 (2018).
28. Н. А. Эпштейн, *Хим.-фарм. журн.*, **53**(12), 48 – 57 (2019); doi: 10.30906/0023-1134-2019-53-12-48-57.
29. U. S. Food and Drug Administration, *Questions and Answers on Current Good Manufacturing Practices – Laboratory Controls*; https://www.fda.gov/drugs/guidances-drugs/

Поступила 13.11.19

SYSTEM SUITABILITY REQUIREMENTS FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS: CONTROLLED PARAMETERS AND THEIR RECOMMENDED VALUES (REVIEW)

N. A. Epshtein

Center for Registration and Development of Medicines, LLC “IRVIN 2”, Moscow, 115446 Russia

* e-mail: naumepshtein@gmail.com

Results of chromatographic analysis can be affected by various factors associated with the chromatographic system. To minimize the risk of the critical influence of such factors on these results, requirements for the system suitability (SS) testing are introduced into the method validation. The review refers to the chromatographic parameters and their recommended values for SS testing. A special feature of the approach is that the parameters are categorized into 5 groups depending on the purpose of their introduction into SS requirements and it takes into consideration the type of the method (isocratic or gradient), the purpose (determination of the content of the main substance or impurities, peak asymmetry, etc.). Some additional intra-laboratory parameters for SS testing used in serial analyzes (routine testing) are studied. For the first time, it is recommendation to enter the condition of $N \sim 0.9N_{exp}$ into SS test for the gradient methods of impurities determination, where N_{exp} is the smallest experimental value of N at which the requirement for system sensitivity (S/N ratio) is still fulfilled for testing before and during the method validation. This condition is justified from theoretical point of view. The attention is drawn to the expediency of robustness testing for the refinement of SS requirements. The data presented in this review significantly supplement recommendations of the European Pharmacopeia, US Pharmacopeia, and State Pharmacopoeia of the Russian Federation for testing the chromatographic system suitability. These recommendations are important for improving reliability of the chromatographic system suitability control.

Keywords: system suitability testing; requirements; liquid chromatography; robustness.