

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236>
УДК 543.544; 615.074



Обзорная статья / Review article

Об аналитических и технологических причинах результатов Out-of-Specification для тестов количественное определение и растворение (обзор)

Н. А. Эпштейн✉

¹Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, 13А

✉ Контактное лицо: Эпштейн Наум Аронович. E-mail: naumepshtein@gmail.com

ORCID: Н. А. Эпштейн – <https://orcid.org/0000-0001-8047-4078>.

Статья поступила: 04.07.2022

Статья принята в печать: 14.02.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

Резюме

Введение. Результаты вне спецификации (OOS results) представляют собой серьезную проблему при разработке, валидации и использовании методик «Количественное определение» и «Растворение». Тема актуальная, что подтверждается данными поиска в Internet по фразе «Out-of-Specification» + «HPLC» – найдено около 35 300 результатов.

Текст. Рассмотрены и систематизированы в виде сводной таблицы важные для практики аналитические и технологические причины (факторы), которые могут приводить к получению заниженных или завышенных результатов анализов. Речь идет о следующих факторах. Факторы, связанные с расчетной формулой. Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов). Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы. Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой. Основные технологические факторы.

Заключение. Представлены данные и рекомендации для поиска аналитических и технологических причин получения результатов Out-of-Specification в случае тестов «Количественное определение» и «Растворение».

Ключевые слова: Out-of-Specification, причины, аналитические и технологические факторы, тест «Количественное определение», тест «Растворение»

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Автор участвовал в сборе информации, ее анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Эпштейн Н. А. Об аналитических и технологических причинах результатов Out-of-Specification для тестов количественное определение и растворение. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(1):227–236. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236>

About Analytical and Technological Reasons of Out-of-Specification Results for Assay and Dissolution Tests (Review)

Naum A. Epshtein✉

Center of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky passage, Moscow, 115446, Russia

✉ Corresponding author: Naum A. Epshtein. E-mail: naumepshtein@gmail.com

ORCID: Naum A. Epshtein – <https://orcid.org/0000-0001-8047-4078>.

Received: 04.07.2022

Revised: 14.02.2023

Published: 24.02.2023

Abstract

Introduction. Out of specification (OOS) results represent a major challenge in the development, validation and use of the Assay and Dissolution methods. The topic is relevant, which is confirmed by Internet search data for the phrase "Out-of-Specification" + "HPLC" – about 35,300 results were found.

Text. The analytical and technological reasons (factors) that can lead to underestimated or overestimated test results are considered and systematized in the form of a summary table important for practice. These are the following factors. Factors associated with the calculation formula. Factors related to the preparation of samples. Factors related to the sample solvent and ratio of the pH the sample solution and the mobile phase. Factors associated with chromatograms and their processing. The main technological factors.

Conclusion. Data and recommendations are presented to search for analytical and technological reasons for obtaining Out-of-Specification results in the case of tests Assay and Dissolution.

Keywords: Out-of-Specification, reasons, analytical and technological factors

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The author participated in the collection of information, its analysis and in writing the text of the article.

For citation: Epshtein N. A. About analytical and technological reasons of Out-of-Specification results for assay and dissolution tests. *Drug development & registration.* 2023;12(1):227–236. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236>

ВВЕДЕНИЕ

Процедура Out-of-Specification (OOS) – «вне спецификации» является актуальной при разработке аналитических методик и технологий получения лекарственных средств, при анализе готовой продукции. Согласно руководству FDA по процедуре Out-of-Specification, «**результаты вне спецификации** включают все результаты испытаний, которые не соответствуют спецификациям или критериям приемлемости, установленным в документах на лекарственные средства, мастер-файлах (DMF) на активные фармацевтические субстанции, официальных руководствах, или производителем лекарственного средства. Этот термин также применяется ко всем текущим лабораторным испытаниям, которые не соответствуют установленным спецификациям» [1]. На практике это означает, что требуется всегда исследовать причины получения заниженных или завышенных результатов анализов. Поиск причины OOS является сложной задачей и требует существенных затрат времени и средств. Об актуальности темы Out-of-Specification говорит результат поиска в Internet данных по фразе «Out-of-Specification» + «HPLC» – найдено около 35 300 ссылок. Однако характерно, что в них рассматриваются только общие вопросы процедуры Out-of-Specification или просто даются ссылки на эту процедуру. Эти сведения важны для организации процедуры OOS, но они недостаточны на практике.

Целью статьи является рассмотрение важных для практики аналитических и технологических причин (факторов), которые потенциально могут приводить к получению заниженных или завышенных результатов анализов.

Прежде всего отметим, что процедура OOS подразумевает в общем случае проверку влияния всех потенциально возможных факторов [2–9]. В связи с этим полезно строить и использовать диаграмму Исикавы; наглядный пример приведен в [3]. В публикации А. Г. Макаренко наиболее подробно рассмотрена полная процедура OOS¹. Выполнение полной процедуры OOS занимает в среднем не меньше 5 рабочих дней², и поэтому стремятся как можно быстрее найти причину OOS. В Интернете опубликованы

SOP по процедуре OOS, например^{3,4,5}. Опубликованы подробный чек-лист⁶ и статистический подход [9] для процедуры OOS. Продается специальная компьютерная программа «Out of Specification Software» фирмы AmpleLogic⁷. В публикации [8] приведены и обсуждены 16 случаев обнаружения результатов OOS при инспекциях FDA.

Причины (факторы), которые способны повлиять на результаты анализов делят на лабораторные – фаза I исследований OOS, и технологические – фаза II [2]. Влияние лабораторных факторов рассматривают в первую очередь. Эти факторы можно условно разделить на рутинные – качество реактивов и растворителей, ошибки исполнителей в записях и расчетах, неверно взятые навески и т. д. [2, 3] и аналитические – обусловленные методикой анализа. Рутинные причины (факторы) OOS перечисляются в большинстве руководств по процедуре Out of Specification. Не рассматриваются конкретные аналитические и технологические причины (факторы), приводящие к заниженным или завышенным результатам анализа. Для логичного обоснования потенциального влияния этих факторов на OOS разобьем их на группы. Можно выделить следующие основные группы факторов. Факторы, связанные с расчетной формулой; Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов); Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы; Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой; Основные технологические факторы.

Рассмотрим каждую из перечисленных ниже групп факторов. Будем обозначать возможность завышения результатов символом ↑, а занижения результатов ↓. При этом предполагается, что выполняются требования пригодности системы [1]. Прономеруем факторы; это будет важно в дальнейшем для быстрого поиска по сводной таблице вероятных причин занижения или завышения результатов анализов.

³ Mubarak Patel. SOP for Handling Out of Specification (OOS). 2020. Available at: <https://www.pharmaceutalksky.com/2020/10/sop-for-handling-out-of-specification.html>. Accessed: 23.09.2022.

⁴ Junki Singh. Pharma Beginners Blog. Out of Specification (OOS) – SOP and Formats. 2020. Available at: <https://pharmabeginners.com/out-of-specification-oos-sop/>. Accessed: 23.09.2022.

⁵ Out Of Specification Investigation Phase II (MHRA). Available at: <https://www.pharmaguideline.net/out-of-specification-investigation-phase-ii-mhra/>. Accessed: 23.09.2022.

⁶ Procedures for handling OOS results. SOP # A-195-02-0100 (with Checklist). Available at: <http://www.locum.co.il/img/sop10.pdf>. Accessed: 23.09.2022.

⁷ Out of Specification Software. AmpleLogic. Available at: <https://amplelogic.com/pharma-focus/qms/out-of-specification-software/>. Accessed: 23.09.2022.

¹ Макаренко А. Г. Работа с результатами вне спецификации (OOS), результатами вне трендов (OOT) и результатами вне ожидаемых (OOE) в соответствии с современными требованиями ЕС. Доступно по: <https://pharm-community.com/wp-content/uploads/wpforo/attachments/8948/301-OutofSpecificationsI2.pdf>. Ссылка активна на 23.09.2022.

² Tim Sandle. Out-of-Specification Laboratory Investigations: New Look at an Old Issue. Institute of Validation Technology. 2018. Available at: <https://www.ivtnetwork.com/article/out-of-specification-laboratory-investigations-new-look-old-issue>. Accessed: 23.09.2022.

Факторы, связанные с расчетной формулой

1. В расчетной формуле ошибка ($\uparrow\downarrow$). Для проверки этого предположения в случае методик с внешним стандартом следует подставить в расчетную формулу следующие значения параметров:
 - Равные значения откликов (площадей S или высот пиков H ; оптической плотности D) для испытуемого и стандартного раствора определяемого вещества. То есть $S = S_0$; $D = D_0$, где индекс «0» относится к стандартному образцу. Заметим, что эти равенства основываются на близости номинальных концентраций определяемого вещества в стандартном и испытуемом растворе.
 - Значения массы образцов a и a_0 и другие данные из расчетной формулы, которые указаны в методике анализа.

Если формула правильная и в указанных в методике значениях a и a_0 нет ошибок, то результат расчета [X в формуле (1)] должен совпадать или быть очень близким к нормируемой величине содержания определяемого вещества.

Пример. Количественное определение кетоконазола в мази. Содержание кетоконазола в препарате (X), в %, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot (P/100) \cdot 5 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot a \cdot 5} = \frac{160 \cdot S \cdot a_0 \cdot (P/100)}{S_0 \cdot a} \quad (1)$$

Подставляем в формулу $S = S_0$ – равные значения площади пика кетоконазола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО кетоконазола; значение массы СО кетоконазола по методике $a_0 = 0,025$ г; содержание кетоконазола в СО берется теоретически как $P = 100$ %; значение номинальной (по методике) массы испытуемого образца мази $a = 2,0$ г. Расчет дает $X = 2$ %, что совпадает с нормируемым значением: $2,0 \pm 0,2$ %. Следовательно формула не содержит ошибок и значения масс стандартного образца и испытуемой пробы указаны правильно.

Аналогичный способ справедлив и для проверки расчетных формул для методов внутреннего стандарта: подставляют не сами значения откликов, а их отношения к откликам внутреннего стандарта.

2. В стандартном образце не учли содержание влаги и остаточных органических растворителей ($\uparrow$) [11]. Из-за этого получается заниженное значение S_0 (или D_0) в формуле типа (1) и, как следствие, завышенное значение X .

Примечание. Для тестов количественного определения и растворения требуется использовать только те стандарты, в сертификатах которых указано содержание основного вещества. При этом содержание основного вещества могут давать в любой из двух следующих форм. ***P* («as it is»; «as is»)** – фактическое содержание основного вещества «как есть», то есть за вычетом примесей, влаги и остаточных органических растворителей (ООР). ***P_{dry}*** – содержание основно-

го вещества в пересчете на сухое вещество (за вычетом влаги и ООР). В связи с этим в расчетных формулах типа (1) вместо массы стандартного образца a_0 должно стоять скорректированное произведение:

$$a_0 \cdot (P/100) \text{ или } a_0 \cdot (P_{dry}/100) \cdot [(100 - W)/100], \quad (2)$$

где W – содержание влаги и остаточных органических растворителей в СО.

Не следует использовать так называемую «чистоту стандарта» (определяемую обычно нормализацией площадей пиков) в качестве содержания основного вещества в СО. При отсутствии первичного СО в продаже целесообразно аттестовывать фармакопейную субстанцию методом баланса масс как первичный лабораторный стандарт [10, 11].

3. *Разложение части основного вещества стандарта из-за гидролиза, окисления и т. д.* ($\uparrow$) [10, 11]. Это приводит к уменьшению отклика S_0 (или D_0) в расчетной формуле типа (1) и, как следствие ведет к занижению результата анализа X . Ситуация характерна для веществ, которые легко подвергаются гидролизу или окислению.
4. В испытуемой субстанции не учли содержание воды и остаточных органических растворителей W ($\downarrow$). Это ведет к занижению результата количественного определения, так как не учли множитель $(100 - W)/100$, на который умножается масса испытуемого образца (расположен в знаменателе формулы для количественного определения).
5. В случае солей или комплексов может иметь место занижение результата анализа из-за того, что не учли в знаменателе пересчет массы испытуемого образца на действующее вещество; при этом в качестве стандарта взяты соль или комплекс ($\downarrow$) [3, 4]. Наиболее характерны такие случаи для антибиотиков и гормональных препаратов. Заметим, что фактическое соотношение действующего вещества и противоиона в соли (или другой молекулы в комплексе) не должно существенно отличаться от теоретического.
6. Испытуемый образец (раствор) вязкий и при взятии его объема часть образца может оставаться внутри пипетки на стенке ($\downarrow$). Однако для определения концентрации препарата в расчетной формуле в знаменателе используют объем образца. Из-за этого могут получить заниженное значение площади пика (оптической плотности) раствора аналита. Поэтому для расчета концентрации вязкого раствора препарата целесообразно использовать в расчетной формуле не объем образца, а отношение массы испытуемого образца к его плотности.

Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов)

7. Неполная экстракция определяемого вещества из пробы ($\downarrow$) [4–6]. Для проверки этого предположения обычно увеличивают продолжительность встряхивания и/или обработки раствора анализи-

руемого образца ультразвуком. В некоторых случаях эффективным оказывается обработка ультразвуком, затем встряхивание или наоборот. Нередко неполная экстракция связана с влиянием оболочки. В таких случаях может помочь *предварительное снятие оболочки*.

Для желудочно-растворимых оболочек. Оболочка этих таблеток должна растворяться или набухать в небольшом количестве воды (реже в 0,01 М HCl) [12]. Поэтому можно взять несколько таблеток (обычно не менее 5) в колбу – при количественном определении, или по одной таблетке в колбу – при тестировании однородности дозирования, добавить небольшое количество воды (или 0,01 М HCl), обработать ультразвуком (встряхивать) для полного или частичного удаления оболочки или образования в ней больших пор, затем добавить растворитель – экстрагирующий определяемое вещество (2/3 объема колбы), обработать ультразвуком (встряхивать), довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать; фильтровать.

Для кишечнорастворимых оболочек проводят снятие оболочки таким же образом, но с использованием раствора соды или щелочи с $\text{pH} \geq 7,8$ [12].

8. При растирании таблеток, покрытых оболочкой, в получающемся порошке имеются кусочки отделившейся оболочки ($\uparrow\downarrow$). Для получения достоверных результатов при анализе таких таблеток целесообразно готовить испытуемый раствор следующим образом. Поместить в мерную колбу определенное количество таблеток (не менее 5 для теста «Количественное определение»). Затем провести экстракцию анализа растворителем при обработке ультразвуком (перемешивании). Довести объем раствора растворителем до метки и перемешать; фильтровать. Можно попробовать предварительно снять оболочку [фактор (7)].
9. Сорбция части определяемого вещества на фильтре; нежелательная сорбция на микроколонке при твердофазной экстракции ($\downarrow$) [12]. Для проверки сорбции фильтром достаточно сравнить площади пиков определяемого вещества на хроматограммах раствора СО без фильтрации и с фильтрацией. Для проверки сорбции на микроколонке следует провести твердофазную экстракцию с модельной смесью препарата с точно известным содержанием определяемого вещества.
10. Калибровочные коэффициенты $a_0/S_0 = k$ – отношение массы стандарта к площади его пика, существенно отличаются для двух навесок стандарта ($\uparrow\downarrow$). При анализе субстанций должно выполняться условие $99,0\% \leq k_1/k_2 \leq 101,0\%$, а при анализе препаратов $98,0\% \leq k_1/k_2 \leq 102,0\%$. Для повышения точности анализа следует подставлять в расчетную формулу $a_0/S_0 = (k_1 + k_2)/2$.
11. Стандартный образец растворился не полностью ($\uparrow$) [10, 11]. Причинами для этого могут быть: плохая растворимость СО, недостаточная продолжительность встряхивания (или обработки ультразвуком), недостаточный объем или неудачный

выбор растворителя. Необходимо контролировать на свету (или со специальной подсветкой) отсутствие частичек стандартного образца в колбе со стандартным раствором. При растворении СО перемешиванием рекомендуется затем кратковременная (секунды) обработка раствора СО ультразвуком.

Заметим, что для обеспечения полного растворения труднорастворимых СО можно использовать предварительное растворение СО в небольшом объеме – обычно не более 1 мл, подходящего органического растворителя, затем доводить объем раствора растворителем, указываемым в методике до метки [12].

12. Стандартный образец частично разложился в растворе ($\uparrow$) или определяемое вещество частично разложилось в растворе ($\downarrow$) из-за термической нестабильности, светочувствительности, действия тепла, сильного ультразвука и т. д. [12]. В случае методики ВЭЖХ нестабильность раствора проявляется в существенном изменении площади пика определяемого вещества на последовательных хроматограммах, снятых в течение суток.
13. Частичная потеря определяемого вещества при растирании образца в ступке ($\downarrow$).

Причины. Потеря в порах ступки, частичная деструкция термолабильных или легко гидролизующихся веществ при растирании образцов.

14. Испарение части растворителя при фильтрации через бумажный фильтр, ускоренном хранении флаконов с раствором и т. д. ($\uparrow$). Это приводит к увеличению концентрации анализа, и, следовательно, к завышению результатов количественного определения.
15. Электризируемость порошка субстанции может приводить к неточному результату взвешивания ($\uparrow\downarrow$). Для нивелирования влияния электризации следует использовать весы со снятием электростатики (обычно используют специальную рамку).
16. Выбросы паров (пробки) при нагревании масел в легко летучем растворителе (например, смеси гексан-метанол) для экстракции анализа ($\uparrow\downarrow$). Для того, чтобы устранить выбросы и их влияние на результаты анализа целесообразно использовать дефлегматор, который вставляется в шлиф колбы с образцом.
17. Сорбция определяемого (лекарственного) вещества вспомогательным веществом ($\downarrow$) [6] Проверка сорбции анализа вспомогательным веществом на фильтре может проводиться следующим образом. Готовят стандартный раствор определяемого вещества. Проводят предварительную обработку фильтра: фильтруют раствор плацебо, приготовленный так как готовится испытуемый раствор. Затем пропускают через обработанный таким образом фильтр часть приготовленного стандартного раствора, отбрасывая первую порцию фильтрата. Полученный раствор (фильтрат) и исходный

стандартный раствор хроматографируют. Затем сравнивают площади пика (оптическую плотность) определяемого вещества на хроматограммах фильтрата и исходного стандартного раствора.

18. *Часть определяемого вещества образует суспензию, выпадает в осадок или образует кристаллы (↓) при охлаждении раствора (из-за снижения растворимости) или при хранении препарата.*
19. *Капсулы. Влияние качества оболочек: частички содержимого капсул могут прилипнуть к желатиновой оболочке (↓) [12]. В подобных ситуациях следует анализировать капсулы целиком.*
20. *Суспензии: неправильный отбор образца (↑↓). Необходимо энергично встряхивать флакон до получения однородной суспензии, быстро открыть его и отобрать пробу, не касаясь пипеткой дна емкости и стенок (чтобы случайно не захватить остаток вещества, если не все вещество суспендировано перешло в раствор).*
21. *Суспензии: осадок на дне флакона с суспензией не растворяется взмучивается даже при энергичном встряхивании (↓). Контролировать отсутствие осадка после встряхивания суспензии (если флакон непрозрачный, то энергично встряхивать суспензию, затем быстро слить ее и убедиться, что на дне флакона не остается прилипший ко дну осадок).*
22. *При приготовлении испытуемого раствора мази может образовываться эмульсия из ее жировой основы, которая может сорбировать часть определяемого вещества (↓). Эмульсию необходимо разрушать.*

Пример. При приготовлении испытуемого раствора мази, содержащей декспантенол образуется жировая эмульсия. Если эмульсию не разрушить, то она может сорбировать часть декспантенола и агрегироваться в виде жирового слоя над поверхностью жидкости в колбе. В этом случае часть D-пантенола останется в жире, и получают заниженный результат определения D-пантенола. Для получения корректного результата жировую эмульсию разрушают. Для этого обрабатывают ультразвуком эмульсию мази в растворе натрия гидрокарбоната pH 10,0 при 60 °C. Механизм разрушения жировой эмульсии – щелочной гидролиз. Значение pH 10,0 выбрано в связи с тем, что D-пантенол (5 % раствор в воде) имеет pH от 9,0 до 10,5. Вне этих пределов вещество гидролизует тем сильнее, чем дальше от этих пределов. Ультразвук необходим для увеличения площади поверхности эмульсии (за счет разбивания более крупных частиц эмульсии на более мелкие частицы, обладающие большей удельной поверхностью). Это увеличивает скорость гидролиза эмульсии.

23. *Объем раствора взят неточно из-за образования пены или недостаточного уравнивания до комнатной температуры (↑↓). Заметим, что пена обычно ведет к занижению объема жидкости и, следовательно, к повышению концентрации раствора. Образование пены свойственно испытуемым растворам со сравнительно высоким со-*

держанием ацетонитрила, а также растворам с пенообразователем, например, с лаурилсульфатом. Проблему пенообразования можно пытаться решать путем добавления пеногасителей, например, добавлением нескольких капель метанола при доведении объема раствора до метки.

24. *Эффект замещения части растворителя вспомогательными веществами – Displacement Effect (↑) [6]. При приливании растворителя к порошку таблеток, содержимому капсул и доведении объема раствора до метки, часть порошка не растворяется. Из-за этого реальный объем среды растворения оказывается меньше на несколько %, чем объем мерной колбы. В большинстве случаев можно пренебречь этим различием. Однако его надо учитывать для больших таблеток (поливитаминных препаратов). Например, добавлять точный объем растворителя пипеткой Мора вместо доведения объема раствора до метки.*
25. *Мерные пипетки недостаточно хорошо отмыты, тогда: (↓) – при приготовлении испытуемых растворов, (↑) – при приготовлении стандартных растворов. Это может существенно влиять на результат анализа, так как загрязнения в виде почти невидимых пленок (капель) остаются внутри пипеток малого объема и существенно уменьшают их фактический объем.*
26. *Центрифугирование суспензий при большом числе оборотов в пробирках из полимерного материала может вызывать разложение части определяемого вещества из-за трения (↓). При этом увеличивается содержание примесей. Например, при анализе таблеток доксозина при центрифугировании в пробирках из полипропилена 10 мин при 8000 об/мин автор наблюдал разложение основного вещества на 0,14 %, а при 3000 об/мин – 0,06 % с соответствующим ростом содержания примесей.*
27. *При центрифугировании сорбция аналита осадком (↓) [6].*
28. *Выпадение осадка или образование мути при охлаждении виалы автосамплера с испытуемым или стандартным раствором (↓↑). В случае испытуемого раствора (↓), а стандартного раствора (↑).*
29. *Дополнительные факторы, приводящие к заниженным результатам теста «Растворение», подробно обсуждены в статье [12].*

Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы

30. *Разные растворители при приготовлении стандартного и испытуемого раствора (↑↓) [12]. При определении растворения флуоксетина из капсул в воде наблюдали завышенную величину растворения ≈140 %. Исследование Out-of-Specification показало, что причиной было разведение исходного раствора СО флуоксетина буфериро-*

ванной подвижной фазой (МР), а не средой теста растворения – водой. Из-за этого в МР и воде оказались различные формы молекул флуоксетина с разными удельными коэффициентами поглощения $E_{1\text{ст}}^{1\%}$.

31. При использовании буферного раствора в качестве растворителя образцов целесообразно предварительно проверить отсутствие муты при смешении близких объемов растворителя образца и подвижной фазы (↓). Образование муты указывает на риск получения заниженного результата анализа.
32. Часть аналита сорбируется на входе в колонку при начальных инъекциях и затем вымывается при последующих инъекциях (↑↓). В начале хроматографирования (↓), затем (↑)

Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой

33. Неточное определение точек начала и конца пика из-за того, что пик имеет размытый передний или задний фронт (длинные хвосты у пика определяемого вещества) (↑↓) [13]. Такая ситуация обычно встречается, если растворитель образца является более сильным элюентом, чем подвижная фаза, или подвижная фаза имеет недостаточную буферную емкость. Для минимизации влияния искажения формы пика на результат анализа целесообразно накладывать хроматограммы стандартного и испытуемого раствора; затем одинаковым образом размечать точки начала и конца пика определяемого вещества.
34. Недостаточная продолжительность хроматограммы может приводить к наложению поздно выходящих пиков на пики определяемых веществ (↑) [13]. В общем случае, для проверки наличия «блуждающих» пиков следует увеличить продолжительность хроматограммы в 3–4 раза по сравнению с указанной в методике.
35. Системный пик, пик плацебо или примеси выходят под пиком аналита (↑↓). Для проверки отсутствия такого перекрытия следует в одинаковых условиях снять и наложить хроматограммы бланк, раствора плацебо и испытуемого раствора. Для оценки возможного влияния пиков примесей на результат анализа целесообразно сравнить спектральную чистоту пика аналита на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов [14].
36. Плохая воспроизводимость площадей (высот) пиков (↑↓) [13].

Возможные причины. Проблемы с работой инжектора, загрязнение фрита на входе в колонку, плохая базовая линия, пузырьки воздуха, заполненная до краев виала Waters, проблемы с работой детектора (низкая энергия лампы, загрязнение ячейки детектора).

37. Пик определяемого вещества частично перекрывается с соседним пиком (↓) при этом имеет место заниженное значение площади пика.
38. Протекание (утечка) только менее вязкого стандартного раствора через прокладку инжектора (↑). Автору известен случай, когда испытуемый раствор определяемого вещества не протекал из инжектора, а менее вязкий раствор СО частично протекал из инжектора. Это приводило к завышению результатов анализа. При этом была приемлемая воспроизводимость площади пика аналита.
39. Проблема с калибровочным графиком (↓↑) [13]. Большой разброс точек данных относительно линии регрессии может привести к некорректному калибровочному графику. Подчеркнем, что экстраполированный калибровочный график (линия регрессии) должен проходить через нулевую точку или в непосредственной близости от нее.

Если для определения содержания аналита используется калибровочный график, то свободный член калибровочного графика должен быть статистически незначим по t-критерию Стьюдента (отсутствие систематической ошибки).

Основные технологические факторы

40. При загрузке фармацевтической субстанции на производстве не учтено содержание в ней воды, органических растворителей (↓).
41. Средняя масса испытуемых таблеток (содержимого капсул) оказалась выше или вблизи допустимого предела средней массы (↑).
42. Средняя масса лекарственной формы находится ниже допустимого значения или в непосредственной близости от него (↓).
43. Неоднородность содержания определяемого вещества в лекарственной форме (↑↓). Причиной может быть нарушение технологического режима. Например, крем получили неоднородным по содержанию лекарственного вещества и консерванта из-за недостаточной продолжительности перемешивания при добавлении плохо растворимых веществ к пропиленгликолю.
44. При использовании установок с псевдооживленным слоем может иметь место потеря (унос) части лекарственного вещества (↓). В таких случаях следует оценить содержание определяемого вещества в пыли с воздушных фильтров, а также в пыли с фильтров, расположенных под кипящим слоем. Затем сопоставить удельное (на грамм) содержание определяемого вещества в пыли и в таблеточной смеси (гранулах).
45. Недостаточная по газонепроницаемости для паров воды первичная упаковка (↓). Гидролиз части определяемого вещества в условиях естественного или ускоренного хранения препарата.
46. Потеря части определяемого вещества на поверхности технологического оборудования (↓).
47. Разложение некоторых лекарственных веществ при технологических операциях, связанных с на-

гревом, растиранием (размолом), прямым прессованием под высоким давлением ($\downarrow\uparrow$) [3, 6]. Разложение лекарственного вещества при растирании (размоле), прямом прессовании удобно детектировать по увеличению содержания примесей. Автору известна ситуация, когда причиной Out-of-Specification оказалось отщепление HCl от молекул гидрохлорида лекарственного вещества в условиях сушки в псевдооживленном слое ($\uparrow$).

48. Образование химического соединения (комплекса) между лекарственным (ЛВ) и вспомогательным (ВВ) веществом ($\uparrow\downarrow$). Много примеров образования таких соединений приведено в обзорах [15, 16]. Показано, например, что кроскармеллоза натрия способна связывать катионы аминокислот

при $\text{pH} > 2$ за счет групп $-\text{COO}^-$. Это приводит к занижению результатов анализов.

49. Нарушение технологического режима по температуре, времени перемешивания, порядку загрузки компонентов лекарственной формы и т. д. ($\downarrow$).

Рассмотренные выше факторы систематизированы в таблице 1 по действию ($\downarrow$), ($\uparrow\downarrow$), ($\uparrow$) – для быстрого поиска возможной причины Out-of-Specification.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные и рекомендации являются важными для целенаправленного поиска аналитических и технологических причин получения результатов Out-of-Specification.

Таблица 1. Факторы, которые могут влиять на результаты тестов «Количественное определение» и «Растворение»

Table 1. The factors that may affect the results of the Assay and Dissolution tests

№ фактора Factor No.	Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа ($\downarrow$) Factors that may cause an understating of the analysis results ($\downarrow$)	Примечание Note
4	В испытуемой субстанции не учли содержание воды и остаточных органических растворителей In the test substance, the content of moisture and residual organic solvents was not taken into account	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
5	В случае соли или комплекса не учли в знаменателе пересчет массы испытуемого образца на действующее вещество In the case of a salt or a complex, the calculation of the mass of the test sample to the active substance was not taken into account in the denominator	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
6	Испытуемый образец (раствор) вязкий и при взятии его объема часть образца может оставаться внутри пипетки на стенке The test sample (solution) is viscous and, when taking its volume, part of the sample can remain inside the pipette on the wall	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
7	Неполная экстракция определяемого вещества из пробы Incomplete extraction of the analyte from the sample	В тексте даны рекомендации The text contains recommendations
9	Сорбция части определяемого вещества на фильтре; нежелательная сорбция на микроколонке при твердофазной экстракции Sorption of a part of the analyte on the filter; unwanted sorption on the microcolumn during solid phase extraction	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
12	Определяемое вещество частично разложилось The substance to be determined is partially decomposed	Причины приведены в тексте The reasons are given in the text
13	Частичная потеря определяемого вещества при растирании образца в ступке Partial loss of the analyte during grinding	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
17	Сорбция определяемого (лекарственного) вещества вспомогательным веществом Sorption of the determined substance (drug) by the excipient	Проверка этого приведена в тексте Verification of this is given in the text.
18	Часть определяемого вещества образует суспензию, выпадает в осадок, образует кристаллы (при охлаждении или хранении раствора препарата) Part of the analyte forms a suspension, precipitates, forms crystals (when cooling or storing a solution of the medicine)	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
19	Капсулы: частички содержимого капсул могут прилипнуть к желатиновой оболочке Capsules: particles of the contents of the capsules may stick to the gelatin shell	Рекомендацию см. в тексте See text for recommendation
21	Суспензии: осадок на дне флакона с суспензией не растворяется Suspensions: the sediment at the bottom of the vial with suspension does not dissolve	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
22	При приготовлении испытуемого раствора мази образуется эмульсия, которая сорбирует аналит When preparing the test solution of the ointment, an emulsion is formed, which sorbs the analyte	Разрушение эмульсии см. текст Breaking the emulsion see text
26	Центрифугирование суспензий при большом числе оборотов в пробирках из полимерного материала может вызывать разложение аналита Centrifugation of suspensions at a high number of revolutions in test tubes made of polymeric material can lead to partial decomposition of the analyte	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text

№ фактора Factor No.	Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа (↓) Factors that may cause an understating of the analysis results (↓)	Примечание Note
27	При центрифугировании сорбция аналита осадком The sorption of the analyte by the precipitate during centrifugation	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
29	Дополнительные причины заниженных результатов теста «Растворение» приведены в [12] Additional reasons for underestimated results of the Dissolution test are given in [12]	Тест «Растворение» Dissolution test
31	При приливании растворителя образца (буферного раствора) к подвижной фазе образуется муть When the sample solvent (buffer solution) is added to the mobile phase, a haze is formed	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
37	Пик аналита частично перекрывается с соседним пиком The analyte peak partially overlaps with the neighboring peak	Заниженная площадь пика аналита Underestimated analyte peak area
40	При загрузке фармацевтической субстанции на производстве не учли содержание в ней воды When loading the drug substance in production, the water content in it was not taken into account	Технологический фактор The technological factor
42	Средняя масса лекарственной формы находится ниже допустимого предела или близко от него The average mass of the dosage form is below the allowable limit or close to the it	Технологический фактор The technological factor
44	В установке с псевдоожиженным слоем происходит потеря (унос) части лекарственного вещества In a fluidized bed unit, some quantity of the drug substance is lost (carried away)	Технологический фактор The technological factor
45	Недостаточная по газонепроницаемости для паров воды первичная упаковка Insufficient gas tightness for water vapor in the primary packaging	Технологический фактор. Гидролиз The technological factor. Hydrolysis
46	Потеря части определяемого вещества на поверхности технологического оборудования Loss of part of the analyte on the surface of the process equipment	Технологический фактор The technological factor
49	Нарушение технологического режима по температуре, времени перемешивания и т. д. Violation of the technological regime in terms of temperature, mixing time, etc.	Технологический фактор The technological factor
Факторы, которые могут вызывать занижение или завышение результатов анализа (↑↓) Factors that may cause an understating or overstatement of the analysis results (↑↓)		
1	В расчетной формуле ошибка There is an error in the calculation formula	Способ проверки см. в тексте See text for verification method
8	При растирании таблеток, покрытых оболочкой, в получающемся порошке имеются кусочки отделившейся оболочки When grinding coated tablets, the resulting powder contains pieces of detached coating	В образцы попадают разные количества оболочки Different quantities of the shell fall into the samples
10	Калибровочные коэффициенты (отношение массы СО к площади его пика) существенно отличаются для двух навесок СО Calibration coefficients (ratio of RS mass to its peak area) are significantly different for two samples of reference standart	Рекомендация дана в тексте The recommendation is given in the text
15	Электризуемость порошка стандарта или аналита может приводить к неточному результату взвешивания The electrifiability of a standard or analyte powder can lead to inaccurate weighing results	Надо снятие электростатики You need to remove electrostatics
16	Выбросы паров (пробки) при нагревании мазей в легко летучем растворителе Vapor emissions (plug), when ointments are heated in a highly volatile solvent	Используйте дефлегматор Use dephlegmator
20	Суспензии: неправильный отбор образца Suspensions: incorrect sampling	Площадь пика (↑↓) The peak area (↑↓)
23	Объем раствора взят неточно из-за образования пены и т. д. The volume of the solution was not accurately taken due to foam formation etc.	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
25	Мерные пипетки недостаточно хорошо отмыты: (↓) – при приготовлении испытуемых растворов, (↑) – при приготовлении стандартных растворов Volumetric pipettes are not well washed after taking the test solutions: (↓) –when preparing test solutions, (↑) – when preparing standard solutions	Уменьшение фактического объема мерной пипетки Reducing the actual volume of the volumetric pipette
28	Выпадение осадка или образование мути при охлаждении виалы автосамплера с испытуемым или стандартным раствором Precipitation or turbidity during cooling of the autosampler vial with test or standard solution	Для испытуемого раствора (↓), а для раствора СО (↑) For the test solution (↓) and the RS solution (↑)

№ фактора Factor No.	Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа (↓) Factors that may cause an understating of the analysis results (↓)	Примечание Note
30	Разные растворители при приготовлении стандартного и испытуемого раствора (↑↓) Different solvents in the preparation of the standard and test solution (↑↓)	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
32	Часть аналита сорбируется на входе в колонку при начальных инъекциях и затем вымывается при последующих инъекциях Part of the analyte is adsorbed at the column inlet during initial injections and then washed out during subsequent injections	В начале хроматографирования (↓), затем (↑) At the beginning of chromatography (↓), then (↑)
33	Неточное определение точек конца и/или начала пика. Характерно для пиков плохой формы Inaccurate definition of end and/or peak start points. Characteristic of badly shaped peaks	Рекомендация дана в тексте The recommendation is given in the text
35	Системный пик, пик плацебо или примеси выходят под пиком аналита The system peak, placebo peak, or impurity peak is eluting under the analyte peak	Чаще всего (↑), редко (↓) Most often (↑), rarely (↓)
36	Плохая воспроизводимость площадей (высот) пиков Poor reproducibility of peak areas (heights)	Возможные причины даны в тексте Possible reasons are given in the text
39	Проблема с калибровочным графиком Calibration chart problem	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
43	Неоднородность содержания определяемого вещества в лекарственной форме Heterogeneity of the content of the analyte in the dosage form	Технологический фактор The technological factor
47	Разложение вещества при технологической операции с нагревом, растиранием (размолом) Decomposition of a substance during a technological operation with heating, grinding (grinding)	Например, отщепление HCl (↑) For example, the elimination of HCl (↑)
48	Образование химического соединения (комплекса) между лекарственным и вспомогательным веществом The formation of a chemical compound (complex) between the drug and the excipient	Технологический фактор The technological factor
Факторы, которые могут вызывать завышение результатов анализа (↑) Factors that may cause an overestimation of the results of the analysis (↑)		
2	В стандартном образце не учли содержание влаги и остаточных органических растворителей In the reference standard did not take into account the moisture content and residual organic solvents	Обоснование приведено в тексте The rationale is in the text
3	Разложение части основного вещества стандарта из-за гидролиза, окисления и т. д. Decomposition of part of the basic substance of the standard due to hydrolysis, oxidation, etc.	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
11	Стандартный образец растворился не полностью The standard sample did not completely dissolve	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
12	Стандартный образец частично разложился в растворе Standard sample partially decomposed in solution	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
14	Испарение части растворителя при фильтрации через бумажный фильтр и т. д. Evaporation of part of the solvent (when filtered through a paper filter, insufficiently sealed containers, etc.)	Концентрация вещества ↑ The concentration of the substance ↑
24	Эффект замещения части растворителя вспомогательными веществами The effect of replacing part of the solvent with excipients	Уменьшение объема раствора Reducing the volume of the solution
34	Недостаточная длительность хроматограммы – наложение поздно выходящих пиков на пик аналита Insufficient duration of the chromatogram – overlapping of late eluting peaks with the analyte peak	Увеличить продолжительность хроматограммы Increase the duration of the chromatogram
38	Протекание (утечка) только менее вязкого стандартного раствора через прокладку инжектора Leakage (leakage) of only the less viscous standard solution through the injector gasket	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
41	Средняя масса таблеток (содержимого капсул) оказалась выше или вблизи допустимого предела The average weight of the tablets (capsule contents) was above or near the allowable limit	Технологический фактор The technological factor

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidance for Industry. Investigating Out-of-Specification (OOS). Test Results for Pharmaceutical Production. Revision 1. Rockville: FDA; 2022.
2. Kelly B. Anderson. Out-of-Specification (OOS) Investigations. Avoiding Complete Failure by Looking at All Pieces of the Puzzle. New York: John Wiley and Sons Ltd.; 2018.
3. Thomas S., Huynh-BaKim K. Highlights of Investigating Out-of-Specifications Test Results. *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*. 2010;229–237. DOI: 10.1007/978-1-4419-0889-6_28
4. Kuselman I., Pennecchi F., Burns C., Fajgelj A., de Zorzi P. IUPAC/CITAC Guide: Investigating out-of-specification test results of chemical composition based on metrological concepts (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2012;84(9):1939–1971. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-10-04.
5. Kumar K. A., Gupta N. V. Handling of Out of Specification Results. Intern. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2015;6(2):38–44.
6. Hemanth K. S., Paneesh C. Handling Out-of-Specification during laboratory incidence. *J. Global Trends Pharm. Sci.* 2019;10(3):6591–6597.
7. McDowall R. D. Are You Invalidating Out-of-Specification (OOS) Results into Compliance? *LCGC North America*. 2020;37(7):411–419.
8. Mote N. N. Reference for Investigation of Out of Specification Results in Pharmaceutical Industry. *Austin Pharmacology & Pharmaceuticals*. 2021;6(1):01–07.
9. Köppel H., Schneider B., Wätzig H. Out-of-specification test results from the statistical point of view. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(3):718–729. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.035.
10. Epshtein N. A. Certification of Pharmaceutical Substances as In-House Primary Standards (Review). *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021; 55(6):47–52. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-47-52.
11. Epshtein N. A. Certification of pharmaceutical substances as in-house primary standards (Review). *Pharm. Chem. J.* 2021;55(6): 616–620. DOI: 10.1007/s11094-021-02466-1.
12. Epshtein N. A. Dissolution Test: Causes of Understated Results and Elimination of These (Overview). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(8):55–59. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-55-59.
13. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Introduction to modern liquid chromatography. 3d ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.; 2010.
14. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
15. Bharate S. S., Bharate S. B., Bajajc A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J. Excipients and Food Chem*. 2010;1(3):3–26.
16. Hotha K. K., Roychowdhury S., Subramanian V. Drug-Excipient Interactions: Case Studies and Overview of Drug Degradation Pathways. *Amer. J. Anal. Chem.* 2016;7(01):107–140. DOI: 10.4236/ajac.2016.71011.

REFERENCES

1. Guidance for Industry. Investigating Out-of-Specification (OOS). Test Results for Pharmaceutical Production. Revision 1. Rockville: FDA; 2022.
2. Kelly B. Anderson. Out-of-Specification (OOS) Investigations. Avoiding Complete Failure by Looking at All Pieces of the Puzzle. New York: John Wiley and Sons Ltd.; 2018.
3. Thomas S., Huynh-BaKim K. Highlights of Investigating Out-of-Specifications Test Results. *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*. 2010;229–237. DOI: 10.1007/978-1-4419-0889-6_28
4. Kuselman I., Pennecchi F., Burns C., Fajgelj A., de Zorzi P. IUPAC/CITAC Guide: Investigating out-of-specification test results of chemical composition based on metrological concepts (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2012;84(9):1939–1971. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-10-04.