

УДК 543.544; 615.074

ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ВЭЖХ И УЭЖХ: СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД, ВКЛЮЧАЮЩИЙ АНАЛИЗ РИСКОВ

Н.А. Эпштейн^{1*}, В.Л. Севастьянова¹, А.И. Королева¹

Резюме. Предложен новый подход к исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, включающий анализ рисков. Он дает возможность надежно обосновывать как выбор, так и исключение определенных факторов при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Подчеркнуто, что исключение любого фактора, связанного с хроматографической системой, из исследования робастности при валидации конкретной методики должно быть надежно обосновано: с привлечением анализа рисков, включающего рассмотрение особенностей хроматограмм и теоретических аргументов. Уровень риска факторов определяется с использованием специальной матрицы и таблицы для оценки критичности фактора и вероятности его критического воздействия на отклики. Приведены и обсуждены основанные на собственном опыте и литературных данных ориентировочные значения пределов изменения факторов, часто имеющих высокий и средний уровень риска. Приведены также ориентировочные значения для допустимых пределов изменения откликов и пример оценки робастности методики определения примесей с помощью анализа рисков и метода «one-factor-at-a-time». Даны рекомендации по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Ключевые слова: робастность, риск, пределы изменения факторов, пределы изменения откликов, валидация, ВЭЖХ, УЭЖХ.

INVESTIGATION OF ROBUSTNESS AT VALIDATION OF HPLC AND UPLC METHODS: A MODERN APPROACH INCLUDING RISK ANALYSIS

N.A. Epshtein^{1*}, V.L. Sevastianova¹, A.I. Koroleva¹

Abstract. A new approach to the robustness investigation of HPLC/UPLC methods that includes use of risk analysis is offered. It allows reliable justification of the choice as well as omission of certain factors at study of the robustness of HPLC/UPLC methods. The risk level of factors is determined using a special matrix and a table to assess the criticality of the factor and the probability of its critical impact on responses. It is emphasized that the exclusion of any factor associated with the chromatographic system from investigation of robustness at validation of a concrete method has to be reliably justified – with the use of a risk analysis including consideration of the features of chromatograms and theoretical arguments. For the factors that often have the high and average level of risk, we provide and discuss the guide values for the limits of the factor change based on our own experience and literary data. We also suggest the guide values for permissible limits of the responses variation as well as an example of assessment of robustness of the method for determining impurities using risk analysis and «one-factor-at-a-time» method. Recommendations are made to study of the robustness of HPLC/UPLC methods.

Keywords: robustness, risk, factor change limits, response change limits, validation, HPLC.

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

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», SC «NIZHPHARM», 6, Avtomobilny Proyezd, Moscow, 109029, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: naumepshtein@gmail.com

Тел.: 8 (985) 771 73 59

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время **робастность** (robustness) аналитических методик (АМ) рассматривают как одну из валидационных характеристик [1, 2], в то время как в прежние годы робастность рекомендовали исследовать только на стадии разработки АМ [3]. Однако если в USP робастность – это обязательная валидационная характеристика, то в ГФ XIII указано, что при валидации АМ устойчивость (точнее – робастность) «может определяться при необходимости» [2]. При этом в ГФ XIII не указаны критерии для оценки такой «необходимости», что на практике означает необязательность исследования робастности при валидации АМ в РФ. Между тем наш опыт экспертизы досье

зарубежных фирм на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты дает основание сделать вывод, что для зарубежных фирм уже стало нормой включение данных по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ в разделы CTD 3.2.S.4.3 и 3.2.P.5.3 («Валидация аналитических методик»). В связи с этим очевидно, что и в РФ станет обязательным включение исследования робастности АМ в валидационную документацию, и к этому надо быть готовыми теоретически и практически.

Общепризнанное определение термина «робастность» в отношении аналитических методик дано в ICH Q2(R1): «робастность аналитической методики является показателем ее способности не поддаваться воздействию небольших, но

контролируемых изменений в ее параметрах, а также надежности методики в нормальных условиях ее применения» [3]. В ICH Q2(R1) также говорится, что оценка робастности «должна демонстрировать надежность анализа под влиянием контролируемых изменений в параметрах метода. Если результаты измерений подвержены воздействию изменений условий применения методики, необходимо обеспечить надлежащий контроль таких условий либо включить в описание методики соответствующее предупреждение. Одним из результатов оценки робастности должно быть определение характеристик пригодности системы (например, разрешения), обеспечивающих пригодность аналитической методики в любых условиях применения» [2, 4]. Иногда термин *robustness* переводят не как «робастность», а как «устойчивость», например в ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIII [2]. В общем случае это правильно. Однако при рассмотрении вопросов, связанных с валидацией аналитических методик, *robustness* лучше переводить именно как «робастность», поскольку имеется еще один валидационный термин – *ruggedness* [1], основное значение которого переводится как «устойчивость» (*ruggedness* соответствует внутрилабораторной прецизионности [1; 4, с. 152]).

В [4] в соответствии с приведенным выше определением робастности подчеркивается, что «решение о том, какие именно изменения могут считаться незначительными, но контролируруемыми, зависит от типа методики и принимается самим аналитиком». Эта формулировка нуждается в существенном дополнении: решение о том, какие именно изменения могут считаться незначительными, но контролируруемыми и какие факторы необходимо включить в исследование робастности методики, зависит от типа методики и принимается самим аналитиком на основании анализа рисков. Это чрезвычайно важное дополнение, так как в соответствии с ICH Q9 при разработке любых процессов и процедур предварительно должен быть проведен анализ рисков [5]. Анализ рисков дает возможность научно обоснованно включать или исключать факторы при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Цель статьи: рассмотреть исследование робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ с привлечением анализа рисков; представить и обсудить апробированные на практике значения пределов изменения факторов, а также допустимых пределов изменения откликов, на которые можно ориентироваться при валидации методик, а также дать рекомендации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РОБАСТНОСТИ

При исследовании робастности аналитических методик обычно применяют один из двух основных методов.

1. Метод одновременного исследования влияния на робастность методики только одного фак-

тора при постоянстве значений всех остальных факторов – метод «one-factor-at-a-time» [4, 6–7] (альтернативное название этого метода «One-variable-at-a-time procedure» [8]). Суть метода заключается в том, что при оценке робастности методики последовательно изменяют значение только одного из факторов, потенциально способных влиять на контролируемые отклики, и оценивают критичность влияния каждого фактора на выполнение требований к этим откликам. Например, сначала изменяют (варьируют) только температуру колонки, а значения остальных факторов остаются неизменными, как в валидируемой методике, затем варьируют только скорость потока и т.д. При этом значение варьируемого фактора берут на определенном верхнем (+1) и на нижнем (–1) пределе/уровне его изменения относительно значения, указанного в методике.

Типичные факторы для методик ВЭЖХ/УЭЖХ приведены на рисунке 1 и в таблице 1, а контролируемые отклики (то есть те, которые должны контролироваться при исследовании робастности методики) приведены в таблице 2.

Критерием робастности аналитической методики является то, что ни один из факторов на пределе/уровне его изменения (+1) или (–1) не способен вызвать такого изменения отклика, что отклик выйдет за допустимый предел. Если установлено, что на пределе изменения фактора хотя бы один из откликов выходит за допустимый предел (критический фактор), то пытаются скорректировать допустимый предел изменения отклика, а если это невозможно – предел изменения фактора, так чтобы значение отклика укладывалось в допустимый предел.

2. Метод математического планирования экспериментов (Design of Experiments; DOE) – метод одновременного исследования влияния нескольких факторов на робастность методики с использованием определенного плана (матрицы) экспериментов. При этом чаще всего используют двухуровневые планы Плакетта – Бермана (Plackett – Burman design), так как они требуют меньшего количества экспериментов по сравнению с другими планами [4, 6–8]. В матрице этих планов каждая строка представляет собой определенную комбинацию всех рассматриваемых факторов на их верхнем (+1) или нижнем (–1) пределе/уровне изменения относительно значения, указанного в методике. Определяют значимые (потенциально критические) факторы и пределы изменения для этих факторов, а также «наихудшие случаи» (the worst-case situation [6]). Для «наихудших случаев» определяют допустимые пределы изменения откликов. Это повышает надежность обоснования требований к пригодности хроматографической системы [6–8]. Определенным недостатком метода DOE является то, что иногда выводы о значимости факторов могут зависеть от критериев значимости, использованных при исследовании робастности методики [9]. Поэтому при исследовании робастности методик с помощью метода DOE рекомендуем для оценки значимых факторов использовать не менее 2–3 критериев [6–9].

Таблица 1.

Обобщенная оценка рисков, связанных с тем, что при тестировании робастности методики ВЭЖХ/УЭЖХ не будет исследовано влияние отдельных факторов, потенциально способных влиять на результаты анализов

№	Объект/фактор*	Критичность	Вероятность	Риск	Примечание
1	2	3	4	5	6
Факторы, связанные с хроматографической системой → исследование робастности при валидации методики					
1.	Состав подвижной фазы (ПФ): содержание более сильного элюента/элюентов в ПФ	Высокая	Средняя	Высокий	Только при изократическом элюировании. Влияние варьирования состава ПФ рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
2.	Состав ПФ: содержание ион-парного реагента	Высокая	Высокая	Высокий	См. рекомендацию выше.
3.	Состав ПФ: содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп	Средняя	Средняя	Средний	То же.
4.	Буфер: значение pH буфера	Высокая	Средняя	Высокий	Влияние pH буфера рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
5.	Буфер: концентрация соли в буфере или ионная сила буфера	Средняя	Средняя/Высокая	Средний/Высокий	Риск высокий только для ион-парной и для ионообменной хроматографии.
6.	Скорость потока ПФ	Средняя	Средняя	Средний	Этот фактор рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
7.	Градиент: значение наклона градиента (G)	–	–	–	Влияние фактора G обычно не исследуют. Ограничиваются исследованием влияния более сильного элюента/элюентов в начальной (B_{min}) и в конечной (B_{max}) точках градиента (строки 8 и 9). Этого достаточно, т.к. $G=(B_{max}-B_{min})/\Delta G$ зависит от B_{max} и B_{min} , а продолжительность градиента ΔG (время) задается с высокой точностью.
8.	Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{min}	Высокая	Высокая	Высокий	Влияние варьирования состава ПФ рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
9.	Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{max}	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
10.	Градиент: длина изократического участка (кроме участка в конце градиента)	Средняя	Высокая/Низкая	Высокий/Низкий	Вероятность и риск высокие только при определенных условиях (см. текст). Влияние длины изократического участка в конце градиента на контролируемые отклики, как правило, исследуют при разработке методики.
11.	Градиент: Dwell Volume	–	–	–	Влияние Dwell Volume учитывается в факторе «хроматограф».
12.	Температура колонки	Средняя	Низкая	Средний	Влияние температуры рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
13.	Температура образца	Средняя	Низкая	Средний	Влияние температуры образца исследуют только в случае термолабильных лекарственных веществ.
14.	Мертвый объем при изократической хроматографии	–	–	–	Влияние мертвого объема учитывается в факторе «хроматограф».
15.	Чувствительность детектора	Высокая	Средняя	Высокий	Критичность и риск высокие только для методик определения примесей. В остальных случаях риск низкий. Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
16.	Длина волны	Высокая	Средняя	Высокий	Риск высокий для методик определения примесей. Для остальных методик риск низкий.
17.	Инжектор (воспроизводимость инжектируемых объемов растворов)	Средняя	Низкая	Низкий	Риск низкий для современных хроматографов.

Окончание табл. 1

№	Объект/фактор*	Критичность	Вероятность	Риск	Примечание
1	2	3	4	5	6
18.	Колонка (серия сорбента)	Средняя	Средняя	Средний	Влияние серии сорбента рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
19.	Хроматограф	Средняя	Средняя	Средний	Проводят анализ испытуемого раствора одного и того же образца на одной и той же колонке на двух хроматографах. При этом оценивается совокупное влияние разных факторов: мертвый объем (изократика) или Dwell Volume (градиент) и т.д. на робастность методики.
20.	Шум базовой линии	Высокая	Низкая	Низкий	При исследовании робастности методик этот фактор не рассматривают, так как в современных методиках определения примесей, а для других методик – при необходимости, предварительно проверяют выполнение требования к отношению «сигнал – шум» базовой линии (S/N) при хроматографировании раствора для проверки чувствительности хроматографической системы [19].
21.	Длительность уравнивания системы до начала хроматографирования и в конце градиента	Высокая	Средняя	Высокий	Влияние этих факторов на отклики обычно исследуют на стадии разработки методики.
22.	Длительность хроматографирования	Высокая	Средняя	Высокий	То же (Примечание: при недостаточной продолжительности хроматографирования пики от предыдущей инъекции могут оказаться на хроматограмме последующей инъекции или, что труднее заметить, выходить между инъекциями).
23.	Раствор для промывки инжектора	Средняя	Средняя	Средний	То же.
24.	Состав раствора для промывки иглы	Средняя	Средняя	Средний	То же.
Факторы, связанные с пробоподготовкой → исследование робастности при разработке методики					
1.	Экстрагент: отношение компонентов и pH	Высокая	Средняя	Высокий	Робастность методики по отношению к этим факторам исследуют на стадии разработки методики.
2.	Отношение массы анализируемого образца к объему экстрагента	Средняя	Низкая	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют редко, причем на стадии разработки методики.
3.	Температура экстракции	Средняя	Средняя	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
4.	Продолжительность экстракции	Средняя	Средняя	Средний	То же (рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3]).
5.	Продолжительность обработки ультразвуком	Средняя	Средняя	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
6.	Продолжительность встряхивания	Средняя	Средняя	Средний	То же.
7.	Фильтр: тип	Высокая	Средняя	Высокий	То же.
8.	Фильтр: диаметр пор	Средняя	Средняя	Средний	То же.
9.	Стабильность растворов	Высокая	Средняя	Высокий	То же (результаты исследования стабильности растворов, как правило, включают в отчеты о валидации методик отдельным пунктом).
10.	Действие света	Средняя	Средняя	Средний	То же.
11.	Ступка (фарфоровая или агатовая)	Средняя	Средняя	Средний	То же.
12.	Дериватизация: продолжительность	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
13.	Дериватизация: температура реакции	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
14.	Дериватизация: концентрация дериватизирующего агента	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
15.	Погрешность мерной посуды	Средняя	Низкая	Низкий	Робастность методики по отношению к этому фактору, как правило, не исследуют.

Примечание: *Жирным шрифтом выделены факторы, которые часто применяются для исследования робастности при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Таблица 2.

Отклики, которые в общем случае необходимо контролировать при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, и их допустимые пределы изменения

№	Отклики (Y)	Обозначение	Единица измерения	Ориентировочные значения допустимых пределов изменения откликов
Отклики, которые используются при оценке уровня риска факторов и при исследовании робастности методик				
1.	Число теоретических тарелок	N	т.т.	Требование по валидируемой методике.
2.	Фактор асимметрии пика основного вещества	$T_{0,05}$ (или A_S)	–	То же.
3.	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	R_S (SS) или v (SS)	–	То же.
4.	Разрешение между двумя другими обсчитываемыми пиками (не указанными в System Suitability), которые наиболее сильно перекрываются, а если таких нет, то между наиболее близко расположенными пиками на хроматограмме испытуемого раствора*	R_S (imp) или v (imp)**	–	Если на хроматограммах возможно частичное перекрывание пиков, то использовать Peak-to-valley ratio $v \geq 1,5$ [21].
5.	Относительное стандартное отклонение площади/высоты пика	RSD	%	Требование по валидируемой методике.
6.	Отношение «сигнал – шум» S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы	S/N	–	То же.
7.	Время удерживания основного вещества при изократическом режиме	RT	мин	$\pm 10\%$.
8.	Время удерживания основного вещества при градиентном режиме	RT	мин	$\pm 15\%$ [13].
9.	Относительные времена удерживания веществ, указанные в методике	RRT	–	$\pm 10\%$ – для изократических методик; $\pm 15\%$ – для градиентных методик.
10.	Спектральная чистота пиков лекарственных веществ и пиков примесей, для которых используются поправочные коэффициенты	Purity	–	Критерии, подтверждающие спектральную чистоту пиков (Purity Plot и количественные критерии).
Отклики, которые используются только при исследовании робастности методик				
11.	Содержание основного вещества	C_0	%	$\pm 2,0\%$ – типичное значение для ГЛС; $\pm (V_N - 100)$ – для субстанций [22, 23], где V_N – верхняя граница нормируемого содержания основного вещества в %.
12.	Содержание идентифицированной примеси	C_{ID}	%	Допустимый предел изменения отклика относительно значения, полученного при номинальных условиях хроматографирования: $\pm 10\%$ для примесей $> 1,0\%$; $\pm 25\%$ для примесей от $> 0,1\%$ до $1,0\%$; $\pm 50\%$ для примесей до $0,1\%$.
13.	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	C_U	%	То же.
14.	Сумма примесей	Σimp	%	То же для Σimp .

Примечание: *Этот отклик предназначен для контроля «наихудшего случая» разделения между пиком примеси и другим пиком (чаще всего другой примеси) на хроматограмме испытуемого раствора. Однако на хроматограмме испытуемого раствора может иметься несколько пар частично перекрывающихся (а если таких нет, то близко расположенных) пиков примесей. В этом случае каждую пару таких пиков следует рассматривать как потенциально «наихудший случай», поскольку разрешение между пиками любой из этих пар может оказаться критическим при исследовании робастности методики. Соответственно рассматривают несколько таких откликов, идентифицируемых, например, по RRT одного из пиков пары.

** R_S (imp) или v (imp), так как хотя бы один из пиков, используемых для расчета этого отклика, является пиком примеси (impurity).

Примечание. В таблицу не включен еще один отклик – поправочный коэффициент CF (Correction Factor), который обычно слабо зависит от большинства факторов, за исключением длины волны, температуры колонки / подвижной фазы [20] и pH. Влияние этих факторов на CF лучше проверять при разработке методики, чтобы при валидации не столкнуться с проблемой недостаточной чувствительности методики.

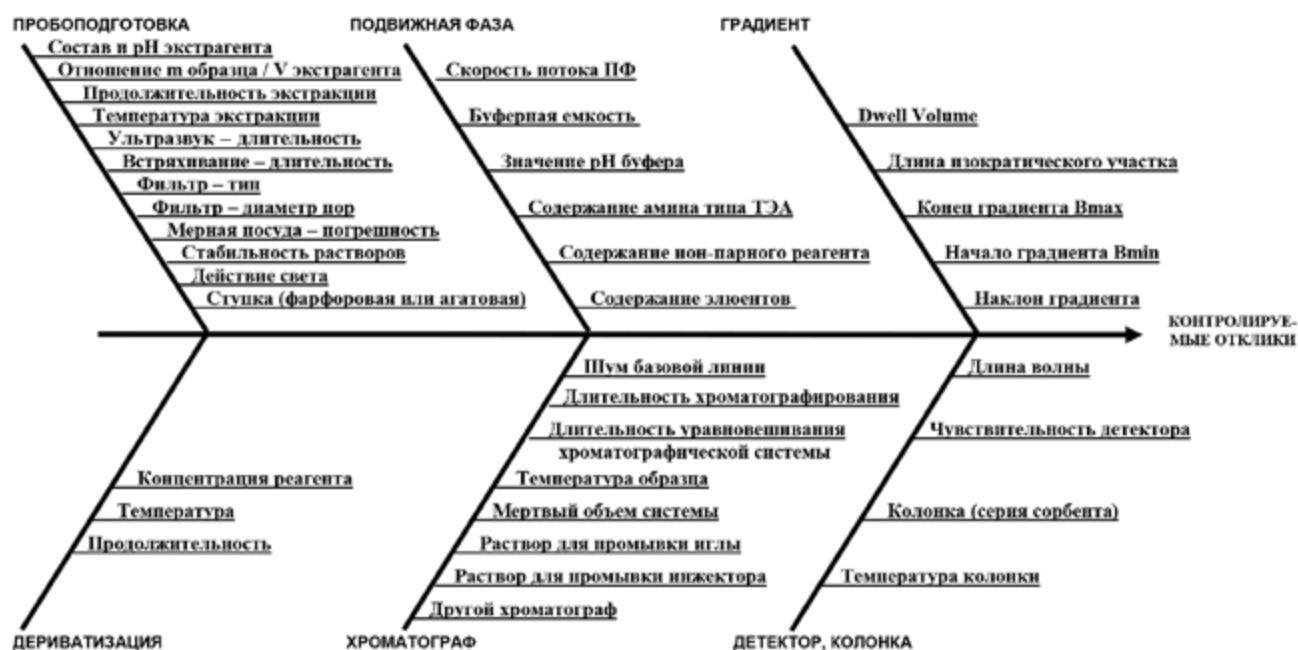


Рисунок 1. Диаграмма Исикавы для факторов, потенциально способных влиять на контролируемые отклики и, следовательно, на робастность методики ВЭЖХ/УЭЖХ¹ (контролируемые отклики – это требования к пригодности хроматографической системы, нормы содержания основных веществ и примесей по спецификации и т.д.; пояснения даны в тексте), V – объем; m – масса

С теоретической точки зрения оценка робастности методик с помощью метода DOE более надежна по сравнению с методом «one-factor-at-a-time». Однако метод «one-factor-at-a-time» пока используют чаще, чем DOE, поскольку он намного проще, нагляднее и не требует применения компьютерных программ.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ВЭЖХ/УЭЖХ

Схему нового подхода к исследованию робастности при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ можно представить следующим образом.

1. Строят диаграмму Исикавы, учитывающую факторы, потенциально способные влиять на контролируемые отклики. Пример для обобщенного случая исследования робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ показан на рисунке 1. Заметим, что для конкретной методики могут не потребоваться некоторые факторы рисунка 1, например факторы, связанные с дериватизацией, с градиентом (для изократических методик) и т.д.

2. Составляют таблицу контролируемых откликов и их допустимых пределов изменения. Примером является таблица 2. Выбор откликов, необ-

ходимых для исследования робастности методик, зависит от их типа (таблица 3).

3. Составляют шаблон таблицы оценки рисков для определенных факторов из диаграммы Исикавы. При этом, как правило, достаточно рассматривать только факторы, связанные с хроматографической системой, и не рассматривать факторы, связанные с пробоподготовкой (пояснение дано ниже). Можно также не рассматривать те из факторов, связанных с хроматографической системой, влияние которых на отклики должно исследоваться при разработке методики (таблица 1).

Шаблон для оценки рисков факторов конкретной методики может иметь следующий вид. Первый столбец – «**Факторы**» (или «Факторы: уровни факторов» – для метода «one-factor-at-a-time»); второй столбец – «**Отклики**» (контролируемые отклики, за исключением тех, которые связаны с нормированием содержания основных веществ и примесей; таблица 2); третий, четвертый и пятый столбцы – соответственно «**Критичность**», «**Вероятность**» и «**Риск**» в баллах (или «высокий», «средний», «низкий»); шестой столбец – «**Обоснование**» (обоснование возможного негативного влияния фактора на отклик). Желательно иметь еще и седьмой столбец – «**Хроматографируемые растворы**» (растворы, которые необходимо хроматографировать при исследовании робастности методики), который важен для понимания того, какие

¹ Не учитываются такие факторы, как качество реактивов; объем инжектора; объем раствора, отбрасываемый в начале фильтрования.

Таблица 3.

Отклики, контролируемые при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ в зависимости от типа методики (общий случай)

№	Отклик	Примеси	Количественное определение	Однородность содержания	Растворение
1.	Число теоретических тарелок	Да	Да	Да	Да
2.	Фактор асимметрии пика основного вещества	Да	Да	Да	Да
3.	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	Да	Нет/Да*	Нет/Да*	Нет/Да*
4.	Разрешение между двумя другими обсчитываемыми пиками (не указанными в System Suitability), которые наиболее сильно перекрываются, а если таких нет, то между наиболее близко расположенными пиками на хроматограмме испытуемого раствора.	Да	Нет	Нет	Нет
5.	Относительное стандартное отклонение	Да	Да	Да	Да
6.	Отношение «сигнал – шум» S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы	Да	Нет	Нет	Нет
7.	Время удерживания основного вещества при изократическом режиме	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*
8.	Время удерживания основного вещества при градиентном режиме	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*
9.	Относительные времена удерживания, указанные в методике	Да	Нет	Нет	Нет
10.	Спектральная чистота пика	Да	Нет	Нет	Нет
11.	Содержание основного вещества	Нет	Да	Да	Да
12.	Содержание идентифицированной примеси	Да	Нет	Нет	Нет
13.	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	Да	Нет	Нет	Нет
14.	Сумма примесей	Да	Нет	Нет	Нет

Примечание: * Да – если значение отклика регламентируется в валидируемой методике; Нет/Да – чаще «Нет», Да/Нет – чаще «Да».

из растворов можно не хроматографировать и тем самым сократить объем работ при исследовании робастности методики.

В качестве шаблона для оценки рисков факторов можно использовать также шаблон, получаемый из таблицы 1, если удалить из нее данные, приведенные в столбцах 3–6. Однако такой шаблон больше подходит для рассмотрения обобщенной оценки рисков в связи с исследованием робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ и менее информативен для конкретных методик.

Примечание. Причину того, что при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ робастность исследуют, как правило, только по отношению к факторам, связанным с хроматографической системой, можно объяснить следующим образом. В случае неробастности методики относительно факторов, связанных с пробоподготовкой, неизбежно потребуются доработка методики и ее повторная валидация. Поэтому исследование робастности методики по отношению к «факторам пробоподготовки» лучше проводить как можно раньше – на стадии разработки методики. Напротив, неробастность методики по отношению к большинству факторов, связанных с хроматографической системой, обычно может быть устранена в ходе валидации методики за счет коррекции требований к пригодности хроматографической системы, введения специальных ограничений

в условия хроматографирования [4] и/или в описание методики.

4. Проводят оценку рисков, заполняя при этом шаблон таблицы оценки рисков. Основная задача таблицы оценки рисков – оценить **риски**, связанные с тем, что при тестировании робастности методики не будет исследовано влияние каких-то факторов, потенциально способных критически повлиять на отклики (те выйдут за допустимые пределы).

Известно, что для оценки риска применяют различные методы [5, 10, 11], причем наибольшее распространение получил FMECA (Failure Mode Effect Criticality Analysis – анализ характера, последствий и критичности отказов) [10]. Для прогноза риска методом FMECA часто используют такие показатели, как «Критичность» (тяжесть «вреда») и «Вероятность» (вероятность негативного влияния фактора), а также «Выявляемость». Последний показатель характеризует возможность обнаружения нежелательных событий; он важен для оценки рисков, связанных с контролем стадий/операций различных процессов: чем выше выявляемость нежелательных событий, тем ниже риск того, что нежелательное событие не будет обнаружено при контроле процесса. При исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, как правило, выявляемость нежелательных событий всегда высокая (легко обнаруживается недопустимое отклонение

откликов от регламентируемых/нормируемых значений, указанных в требованиях к пригодности хроматографической системы, в спецификации и т.д.). Поэтому при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ для оценки риска и выбора значимых факторов достаточно использовать только показатели «Критичность» и «Вероятность», а риск оценивать по формуле **«Риск = Критичность x Вероятность»**. При этом «Критичность» фактора определяется степенью его влияния на контролируемые отклики, а «Вероятность» – вероятностью того, что фактор может повлиять на какой-то из контролируемых откликов столь сильно, что отклик выйдет за допустимый предел. Предлагаемый способ оценки риска при исследовании робастности методик формально похож на анализ риска методом FMEA [10, 11], однако в FMEA не рассматривается критичность отказов.

На рисунке 2 представлена таблица для оценки критичности факторов и вероятности критического воздействия факторов на отклики. Там же приведена простая и тем не менее достаточно эффективная матрица для оценки риска по формуле «Риск = Критичность x Вероятность». Красным ячейкам соответствует высокий риск, желтым – средний риск и зеленым – низкий риск. Отметим два важных момента. Во-первых, то, что таблицу и матрицу на рисунке 2 можно применять для оценки риска при исследовании робастности любых хроматографических методик; во-вторых, для более дифференциальной оценки риска можно было бы использовать не матрицу 3x3, как на рисунке 2, а, например, 3x5 (3 – для «Критичности») или 5x5. Однако для этого пока недостаточно статистической информации по влиянию факторов на контролируемые отклики.

В таблице 1 приведены результаты обобщенной оценки рисков в связи с исследованием робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Результаты оценки рисков факторов, представленных в таблице 1, можно использовать для любых методик ВЭЖХ/УЭЖХ как «наихудший случай». В то же время следует иметь в виду, что при оценке риска для конкретных методик риск для некоторых факторов, в отличие от таблицы 1, может оказаться низким, что дает возможность исключить такие факторы из исследования робастности и снизить затраты при валидации методики. Например, в случае методик определения содержания основных веществ или методик определения примесей методом изократической ВЭЖХ/УЭЖХ фактор «Скорость потока ПФ» чаще всего будет иметь низкий риск.

Важно подчеркнуть, что исключение любого фактора, связанного с хроматографической системой, из исследования робастности при валидации конкретной методики должно быть надежно обосновано с привлечением анализа рисков, включающего рассмотрение особенностей хроматограмм и теоретических аргументов (рисунк 2).

При оценке риска следует учитывать риски, связанные с трансфером методики и ее использованием при разовом внешнем контроле продукции. Поэтому для методик определения примесей не

следует пренебрегать исследованием влияния разных серий сорбента, так как подавляющее большинство сорбентов производится сравнительно небольшими сериями. Надо также учитывать возможность использования методики не только на том хроматографе, который указан в методике, но и на однотипных хроматографах (близких по характеристикам), в том числе других производителей. В связи с этим при валидации методики не следует пренебрегать проверкой робастности методики на двух однотипных хроматографах, желательно разных производителей, если такая проверка не проведена при разработке методики.

		Вероятность		
		Низкая (1)	Средняя (2)	Высокая (3)
Критичность	Высокая (3)	3	6	9
	Средняя (2)	2	4	6
	Низкая (1)	1	2	3

КРИТИЧНОСТЬ	ВЕРОЯТНОСТЬ
ВЫСОКАЯ (3) – если изменение фактора может вызвать выход хотя бы одного из контролируемых откликов за допустимые пределы.	ВЫСОКАЯ (3) – если на основании хроматограмм, полученных при разработке методики и валидации ее специфичности, и теоретических аргументов можно сделать вывод о том, что фактор с высокой вероятностью может вызвать такое изменение хотя бы одного контролируемого отклика, что отклик выйдет за допустимые пределы.*
НИЗКАЯ (1) – если изменение фактора не может оказать влияния ни на один из контролируемых откликов.	НИЗКАЯ (1) – если на основании хроматограмм, полученных при разработке методики и валидации ее специфичности, и теоретических аргументов можно сделать надежно обоснованный вывод о низкой вероятности того, что фактор сможет вызвать такое изменение хотя бы одного контролируемого отклика, что отклик выйдет за допустимые пределы.*
СРЕДНЯЯ (2) – если нет надежных оснований для оценки критичности фактора ни как высокой, ни как низкой.	СРЕДНЯЯ (2) – если нет надежных оснований для оценки вероятности ни как высокой, ни как низкой.

Примечание: *Валидация специфичности методики должна включать стрессовые эксперименты [18]. К теоретическим аргументам относятся известные из теории закономерности влияния факторов на время выхода, высоту, ширину и асимметрию пиков; на их смещение в сторону начала или конца хроматограммы, а также наличие или отсутствие на хроматограммах близко расположенных пиков; близость или удаленность отношения S/N (сигнал/шум базовой линии) от минимально допустимого значения S/N и т.д.

Рисунок 2. Матрица и таблица для оценки риска, связанного с тем, что влияние фактора не будет исследовано при оценке робастности методики. Красные ячейки – высокий риск, желтые – средний риск, зеленые – низкий риск

5. Составляют таблицу факторов высокого и среднего риска и пределы их изменения. В ней для каждого фактора указывают название фактора и его обозначение, номинальное значение по методике, единицу измерения, пределы изменения в %, а также фактические значения на нижнем (–1) и на верхнем (+1) пределах [4, с. 192]. Для качественных факторов, например для хроматографической колонки, значение, соответствующее (+1), присваивают колонке с одной серией сорбента, а (–1) – колонке с другой серией такого же сорбента.

Нередко трудность вызывает обоснованный выбор пределов изменения факторов. В связи с этим можно воспользоваться данными из таблицы 4: в ней приведены ориентировочные значения пределов изменения для факторов, которые часто имеют высокий и средний уровень риска.

6. Составляют матрицу планирования экспериментов (Experimental design matrix). В этой матрице первый столбец содержит номера экспериментов, следующие столбцы – наименования факторов (заглавие столбцов) и их уровни (+1; –1) или фактические значения. Такое построение матрицы планирования экспериментов удобно, так как каждая строка в ней – это определенные условия хроматографирования.

Особенностью матрицы метода «one-factor-at-a-time» является то, что в любой строке может находиться только один из факторов на уровне, отличном от номинального. Напротив, при использовании метода DOE в любой строке матрицы должна находиться комбинация уровней всех рассматриваемых факторов; кроме того, в матрицу DOE часто включают **фиктивные факторы** (dummy factors) для оценки статистической значимости влияния факторов на отклики.

Таблица 4.

Факторы высокого и среднего риска из таблицы 1, связанные с хроматографической системой, и ориентировочные значения пределов изменения этих факторов

№	Факторы (X)	Единица измерения	Ориентировочные значения пределов изменения фактора
1.	Содержание более сильного элюента/элюентов в подвижной фазе (ПФ) при изократическом элюировании	% (об)	±5% относительных (отн.) – типичное значение; минимальное значение: ±2% (отн.) – для бинарных ПФ, получаемых с использованием мерной посуды; ±1% (отн.) – при приготовлении ПФ путем взвешивания компонентов или при прямом смешении в хроматографе ПФ, приготовление которых не требует использования мерной посуды. Если в ПФ имеется несколько сильных элюентов и для приготовления ПФ используется мерная посуда, то следует рассматривать «наихудшие случаи» (см. текст).
2.	Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – V_{min}	%	То же.
3.	Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – V_{max}	%	То же.
4.	Содержание ион-парного реагента в ПФ	мг/л	Такие же числа, но в абсолютных процентах.
5.	Содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп	мл/л	Такие же числа, но в абсолютных процентах.
6.	Значение pH буфера	pH	±0,2 pH [13] – типичное значение.
7.	Скорость потока ПФ	мл/мин	±10% [4] – типичное значение.
8.	Длина волны 1	нм	±2 нм [13] – типичное значение.
9.	Колонка	-	Колонка, содержащая такой же сорбент, но другой серии.
10.	Концентрация соли в буфере или ионная сила буфера	мг/мл	±10% [13].
11.	Градиент: длина изократического участка (кроме стадии уравнивания колонки)	мин	±1%.
12.	Температура колонки	°C	±3 °C [4] – типичное значение; ±2 °C – минимальное значение.
13.	Температура образца (для термолabileльных веществ)	°C	±3 °C – типичное значение; ±2 °C – минимальное значение.
14.	Хроматограф	–	Однотипный хроматограф, желательно другого производителя.

Примечания: ¹Влияние фактора «длина волны» на робастность методики исследуют только для методик определения примесей.
Примечание: ориентировочные значения пределов изменения факторов, связанных с пробоподготовкой, приведены в [24, р. 455].

7. Проводят эксперименты в соответствии с матрицей планирования экспериментов; оценивают робастность методики и при необходимости корректируют допустимые пределы изменения откликов и/или пределы изменения факторов.

При условиях хроматографирования, задаваемых строками матрицы планирования экспериментов, хроматографируют растворы в последовательности, указанной в методике, робастность которой оценивают. Дальнейшая оценка робастности методики зависит от используемого метода исследования робастности методики.

В случае применения метода «one-factor-at-a-time» действия простые. Для каждого фактора на нижнем и на верхнем пределе/уровне проверяют, находятся ли экспериментально полученные значения откликов в допустимых пределах. Если нет, то рассматривают возможность скорректировать допустимые пределы изменения откликов и/или пределы изменения фактора таким образом, чтобы контролируемые отклики не выходили за их скорректированные/допустимые пределы.

При применении метода DOE действия более сложные и требуется компьютерная программа для обсчета экспериментальных данных, например в соответствии с формулами, приведенными в [6]. Определяют значимые (потенциально критические) факторы с помощью специальных процедур, основанных на математической статистике. Для каждого значимого фактора вычисляют скорректированные пределы его изменения. Устанавливают «наихудшие случаи» для откликов – определенные комбинации предельных и номинальных значений факторов, проводят при этих комбинациях факторов эксперименты и вычисляют скорректированные допустимые пределы изменения откликов [6].

Полученные скорректированные значения допустимых пределов изменения откликов и/или пределов изменения факторов используют для уточнения и обоснования требований к пригодности хроматографической системы (ППХС). Если это возможно, то актуализируют требования ППХС; часто оказывается, что методика не требует коррекции допустимых пределов изменения откликов и в нее не надо вводить допустимые пределы изменения факторов, – во всех этих случаях делают вывод о робастности методики. В противном случае делают вывод о необходимости доработки методики.

Примечание. Для снижения риска неправильной оценки робастности методик определения примесей в новых препаратах рекомендуем для приготовления испытуемого раствора брать образец, характеризующий профиль примесей на конце срока годности препарата. Например, для приготовления испытуемого раствора использовать образец препарата или его модельную смесь, выдержанную в климатической камере

при повышенной температуре в течение срока, эквивалентного заявляемому сроку годности препарата.

В матрицах планирования экспериментов каждая строка рассматривается как эксперимент [6], при этом количество строк в матрицах планирования экспериментов обычно не превышает 15 [4, 6–8]. Это может ввести в заблуждение («Всего 15 экспериментов?») и вызвать недооценку реального объема исследовательских работ. Дело в том, что строки в матрице планирования экспериментов – это разные условия хроматографирования; в соответствии с каждой строкой необходимо хроматографировать все растворы по валидируемой методике, причем некоторые растворы – до 5 повторностей. В результате этого объем работ при валидации градиентных методик определения примесей может возрасти в 1,5–2 раза! *В связи с этим надо творчески подходить к исследованию робастности методик и привлекать теоретические знания для обоснования возможности уменьшения объема исследований.* Прежде всего это касается аргументированного обоснования исключения некоторых факторов из исследования робастности методики в связи с низким риском. Для остальных факторов – высокого и среднего риска – объем исследований можно попытаться сократить путем исключения хроматографирования некоторых растворов. Например, при скорости потока ПФ на уровне (+1) можно не хроматографировать раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, достаточно указать в таблице результатов, что отношение «сигнал – шум» $S/N \geq 10$ (или иное требование по методике), как показано в таблице 6.

О ПРЕДЕЛАХ ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РОБАСТНОСТИ МЕТОДИК ВЭЖХ И УЭЖХ

При исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ особое внимание следует уделить пределам изменения факторов (LF; limits of the factor change): они должны обеспечивать надежность трансфера методики [4, 6]. Для установления LF теоретически можно было бы задавать LF на основании прецизионности или неопределенности значений факторов при номинальных условиях [4, с. 186; 6]. Однако при выборе LF, как правило, основываются на практическом опыте [4, 6]. В связи с этим особый интерес для исследователей робастности аналитических методик могут представлять ориентировочные значения пределов изменения факторов высокого и среднего рисков, приведенные в таблице 4.

Факторы, связанные с составом подвижной фазы. Отметим, что в таблице 4 у таких факторов, как «Содержание более сильного элюента/элюентов в ПФ (изократика)», «Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или %

более сильной ПФ – $V_{\min}$ », «Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – $V_{\max}$ », пределы изменения выражены в относительных процентах, а у факторов «Содержание ион-парного реагента в ПФ» и «Содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп» – в абсолютных процентах¹.

Пределы изменения вышеупомянутых факторов должны учитывать погрешность мерной посуды, используемой для измерения объема компонентов подвижной фазы (ПФ), и точность смешения подвижных фаз в хроматографе (ТСФ), в процентах. При этом предполагается, что погрешностью взвешивания можно пренебречь по сравнению с погрешностью измерения объемов. На практике суммарная погрешность мерной посуды, используемой при приготовлении ПФ, плюс ТСФ, как правило, не превышает $\pm 5\%$, поэтому величину $\pm 5\%$ можно рассматривать как типичный предел изменения для вышеупомянутых факторов. Минимальное значение предела изменения этих факторов – $\pm 2,0\%$ для бинарных ПФ, получаемых с использованием мерной посуды. Оно реально достижимо на практике, учитывая, например, что у хроматографов Alliance Waters e2695 при смешении ПФ «composition assigasy» составляет $0,5\%$ [12]. При приготовлении ПФ можно использовать не объемы, а массы компонентов. Этот способ, а также прямое смешение в хроматографе ПФ, приготовление которых не требует использования мерной посуды, может дать возможность дополнительно сузить допустимый интервал варьирования факторов до $\pm 1\%$ (но не меньше ТСФ).

Если в ПФ имеется несколько сильных элюентов, то нельзя ограничиваться изменением содержания только одного сильного элюента, так как каждый из них может влиять на специфичность методики. На практике неоднократно встречались случаи, когда даже при большом различии содержания сильных элюентов существенным оказывалось влияние каждого из них на времена удерживания веществ, разрешение между пиками и т.д. Поэтому если в ПФ имеется 2 и более сильных элюента, то для оценки влияния содержания элюентов на робастность методики следует рассматривать «наихудшие случаи», учитывающие влияние погрешности мерной посуды, используемой для измерения объема элюентов, а также ТСФ, если элюенты смешиваются непосредственно в хроматографе. «Наихудшими случаями» будут те, при которых: а) содержание сильных элюентов соответствует их верхнему пределу изменения, а содержание сла-

бого элюента – нижнему пределу; уровень (+1), и наоборот: б) содержание сильных элюентов соответствует их нижнему пределу изменения, а слабого элюента – верхнему пределу; уровень (–1). Например, для ПФ ацетонитрил – метанол – буфер при приготовлении ПФ уровню (+1) будет соответствовать увеличение объема ацетонитрила и метанола (каждого) на 2% (отн.) и уменьшение объема буферного раствора на 2% (отн.) относительно их номинальных значений.

Учет погрешности мерной посуды и ТСФ может оказаться проблематичным. В таких случаях можно воспользоваться следующим простым правилом: в качестве предела изменения содержания/объема каждого элюента достаточно использовать $\pm 2,0\%$. Основанием является то, что $2,0\%$ практически всегда больше суммы погрешности мерной посуды, используемой для измерения объема элюента, и ТСФ.

Значение pH буфера. В качестве типичного значения предела изменения pH буфера при исследовании робастности методик рекомендуем $\pm 0,2\text{pH}$ [13], которое встречается в подавляющем большинстве публикаций. Подчеркнем, что наименьшее значение предела изменения pH буфера, встречавшееся в литературе, составляет $\pm 0,1\text{pH}$, например [4], и это, по-видимому, связано с тем, что погрешность измерения pH может достигать $\pm 0,03\text{pH}$, а иногда и больше [14]. Если методика очень чувствительна к изменению pH и остается робастной лишь в пределах области «номинальное значение $\text{pH} \pm 0,2\text{pH}$ », то рекомендуем ужесточить требование к точности доведения pH до $\pm 0,02\text{pH}$, а также к калибровочным растворам, а именно использовать первичные калибровочные буферные растворы с декларированным значением до $\pm 0,005\text{ pH}$ (например, NIST buffers [15]).

Скорость потока ПФ (F). В литературе по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ наиболее часто используют предел изменения скорости потока $\Delta F = \pm 10\%$, например [4]. Это значение можно рассматривать как типичное. Однако $\Delta F = \pm 10\%$ не годится, если на хроматограмме испытуемого раствора имеются очень близко расположенные и тем более частично перекрывающиеся пики примесей. Неудивительно поэтому, что минимальное значение ΔF , встретившееся в литературе, составляет $\pm 2,5\%$ [16] и $\pm 2,0\%$ – при экспертизе досье на препараты.

В спецификациях на современные ВЭЖХ-хроматографы можно увидеть значения «Flow assigasy» $\pm 1,0\%$ или $10\text{ }\mu\text{l/min}$ (то, что больше) для широкого диапазона F [12, 17]. Фраза «... $\pm 1,0\%$ или

¹ Поскольку термины «Элюент» и «Подвижная фаза» близки, здесь важно отметить следующее. Элюент (Eluent) – растворитель, однокомпонентный или смесь, содержащая иногда также твердые вещества (модификаторы), формирующий подвижную фазу [25]. Подвижная фаза может представлять собой как один элюент, так и смесь элюентов. Если речь идет о смешении жидкостей – потоков в хроматографе, то для обозначения потока следует использовать термин «подвижная фаза», например «Подвижная фаза А», но не «Элюент А», даже если ПФ состоит из одного элюента.

10 µl/min (то, что больше)» указывает на то, что «Flow accuracy» зависит от F , причем при $F \geq 1,0$ ml/min «Flow accuracy» находится в пределах $\pm 1,0\%$, а при $F < 1,0$ ml/min – больше, чем $\pm 1,0\%$. Например, при $F = 0,5$ ml/min «Flow accuracy» = $(10 \text{ µl/min} \times 100) / 500 \text{ µl/min} = 2,0\%$. В связи с этим следует относиться с осторожностью к использованию низких значений предела изменения F , особенно к $F < 2,0\%$, из-за возможного суммирования противоположных по знаку погрешностей F между хроматографами при трансфере методики.

Длина волны (λ). В качестве предела изменения λ берут $\lambda = \pm 2$ нм [4], основываясь на требованиях ведущих фармакопей [1, 2, 19].

Концентрация соли в буфере или ионная сила буфера. Типичное значение предела изменения этого фактора – $\pm 10\%$ в соответствии с [13].

Градиент: длина изократического участка (кроме стадии уравнивания колонки). Исследование влияния длины изократических участков градиента на робастность методик целесообразно проводить только в случае, если в точке перехода от изократического участка к градиентному или от градиентного к изократическому или очень близко к этой точке имеются пики веществ, содержание которых требуется определять. При этом в качестве предела изменения этого фактора достаточно брать $\pm 1\%$ (так как современные хроматографы имеют очень высокую точность задания длин всех участков градиента) и указывать Dwell Volume.

Температура колонки. Типичное значение предела изменения – $\pm 3,0$ °C [4]. Аналогичное значение можно использовать и для предела изменения фактора «Температура образца» (для термолабильных веществ). Заметим, что, хотя производители хроматографического оборудования указывают погрешность задания температуры, как правило, не больше $\pm 1,0$ °C, предел изменения температуры колонки или образца должен быть не меньше чем $\pm 2,0$ °C. Это связано прежде всего с тем, что в термостате возможно неравномерное распределение температуры (тем более что температура, как правило, контролируется только в одной-двух точках), а также с тем, что температура ПФ в начале колонки и на выходе может зависеть от скорости потока ПФ и от температуры ПФ в резервуарах.

«Длительность уравнивания системы» (до начала хроматографирования и в конце градиента) и «Длительность хроматографирования». Хотя при валидации методик, как правило, не исследуют влияние этих факторов, тем не менее, учитывая их чрезвычайную важность для робастности методик, считаем необходимым отметить следующее.

Перед составлением плана валидации методики обязательно следует проверить, получены ли в ходе разработки методики данные, которые, во-первых, подтверждают достаточность продолжительности

уравнивания системы перед началом хроматографирования, а также по завершении градиента; во-вторых, доказывают, что пики от предыдущей инъекции не попадают на хроматограмму последующей инъекции и не выходят между инъекциями. Если этих данных нет, то ставят вопрос о необходимости их получения в рамках разработки методики, а если это невозможно, то такие исследования включают в план валидации по показателю «робастность». В качестве предела изменения вышеупомянутых факторов целесообразно использовать $+150 \div 200\%$ (1,5–2 раза).

ПРИМЕР ОЦЕНКИ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ ВЭЖХ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА «ONE-FACTOR-AT-A-TIME»

В качестве примера ниже приведена оценка робастности градиентной методики ВЭЖХ для определения примесей в лекарственном препарате, выполненная в рамках валидации методики. Использован метод «one-factor-at-a-time». Условия хроматографирования: колонка XBridge C18, 4,6x150 мм, 5 мкм; подвижная фаза (ПФ) А: кислота – тетрагидрофуран – вода (4:30:1000); подвижная фаза В: муравьиная кислота – тетрагидрофуран – метанол (4:30:1000); скорость потока $F = 1$ мл/мин; объем пробы 10 мкл; хроматограф Waters Alliance 2695: детектор PDA, 254 нм; температура колонки 30 °C; градиент: 0 мин (А:В=90%:10%); 40 мин (А:В=0%:100%); 41 мин (А:В=90%:10%); 50 мин (А:В=90%:10%). Риск, связанный с исключением фактора из исследования робастности методики, оценивали по формуле «Риск = Критичность x Вероятность» (рисунок 2). В таблице 5 приведены факторы высокого и среднего риска, использованные для исследования робастности рассматриваемой методики, а также пределы изменения этих факторов. Отметим, что риски, связанные с варьированием температуры колонки и образца, в пределах ± 3 °C были оценены как низкие; кроме того, не исследовали влияние $V_{\max}$, так как по методике $V_{\max} = 100\%$.

Последовательно изменяли один из факторов (таблица 5) при постоянстве других факторов; при этом каждый фактор брали сначала на одном уровне, затем на другом. Хроматографировали бланк, раствор для определения чувствительности хроматографической системы (ПЧХС), раствор сравнения, раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор. Определяли контролируемые отклики. Полученные результаты представлены в таблице 6. Из таблицы 6 видно, что все контролируемые отклики не выходят за допустимые пределы изменения, задаваемые условиями $\geq$ или $\leq$, или $\pm \Delta$, %. Поэтому можно сделать заключение о робастности методики.

Таблица 5.

Факторы высокого и среднего риска, потенциально способные влиять на робастность методики определения примесей в лекарственном препарате, и их пределы изменения

№	Факторы	Единица измерения	Значение по методике	Пределы изменения	Уровень -1	Уровень +1
1.	Скорость потока (F)	мл/мин	1,0	±10%	0,9	1,1
2.	Градиент: начальная концентрация более сильной подвижной фазы (B _{min})	%	10,0	±2% отн.	9,8	10,2
3.	Градиент: конечная концентрация более сильной ПФ (B _{max})	%	100	±2% отн.	98	–
4.	Длина волны (λ)	нм	254	±2нм	252	256
5.	Колонка*	–	–	–	Колонка 1	Колонка 2

Примечание: * Хроматографическая колонка 2 содержит такой же сорбент, что и колонка 1, но другой серии.

Таблица 6.

Экспериментальные результаты определения откликов при номинальных (по методике) и при предельных значениях факторов

Факторы (X) \ Отклики (Y)	Пределы изменения откликов	Результат по методике	F (-10%)	F (+10%)	Bmin (-2%)	Bmin (+2%)	Bmax (-2%)	λ (-2 нм)	λ (+2 нм)	Другая серия сорбента
Эффективность хроматографической колонки (N)	≥10000 т.т.	122809	136288	115966	108559	112002	107717	129130	125813	118978
Фактор асимметрии (T _{0,05}) пика лекарственного вещества (ЛВ) на хроматограмме раствора сравнения	≤1,5	1,06	1,05	1,05	1,02	1,07	1,04	1,03	1,04	1,02
Разрешение (Rs) между пиками ЛВ и примеси с RRT около 1,15	≥2,0	5,77	5,70	5,91	5,75	5,58	5,72	5,75	5,73	6,13
Относительное стандартное отклонение площади пика ЛВ (RSD)	≤5,0 %	1,53	0,32	1,52	1,05	0,77	0,21	1,16	0,41	0,39
Отношение «сигнал – шум» S/N	≥10	31	29	(≥10)	37	41	29	32	24	50
Содержание примеси с RRT около 1,15	Δ=±50%	0,03%	0,02% Δ=-33,3%	0,02% Δ=-33,3%	0,03% Δ=0,0%	0,03% Δ=0,0%	0,04% Δ=33,3%	0,03% Δ=0,0%	0,03% Δ=0,0%	0,02% Δ=-33,3%
Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	Δ=±50%	0,08%	0,07% Δ=-12,5%	0,07% Δ=-12,5%	0,08% Δ=0,0%	0,08% Δ=0,0%	0,08% Δ=0,0%	0,07% Δ=-12,5%	0,07% Δ=-12,5%	0,07% Δ=-12,5%
Сумма примесей	Δ=±25%	0,11%	0,09% Δ=-18,2%	0,09% Δ=-18,2%	0,11% Δ=0,0%	0,11% Δ=0,0%	0,12% Δ=9,1%	0,10% Δ=-9,1%	0,10% Δ=-9,1%	0,09% Δ=-18,2%
Время удерживания основного вещества	Δ=±15%	16,936 мин	17,635 Δ=+4,1%	16,267 Δ=-4,0%	17,039 Δ=+0,6%	16,835 Δ=-0,6%	17,225 Δ=+1,7%	16,936 Δ=0,0%	16,936 Δ=0,0%	16,311 Δ=-3,7%
Относительное время удерживания (RRT) идентифицированной примеси	Δ=±15%	0,33	0,35 Δ=6,1%	0,32 Δ=-3,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%
Спектральная чистота пика ЛВ	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, включающий анализ рисков. Он дает возможность более надежно обосновывать как выбор, так и исключение определенных факторов при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Проведена обобщенная оценка рисков, связанных с тем, что при тестировании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ не будет исследовано влияние некоторых факторов, потенциально способных влиять на результаты анализов. Подчеркнуто, что робастность методик необходимо исследовать по отношению ко всем факторам высокого и среднего риска.

Уровень риска факторов зависит от конкретной методики и определяется с использованием специальной матрицы и таблицы для оценки критичности фактора и вероятности его критического воздействия на отклики. Для факторов, часто имеющих высокий и средний уровень риска, приведены ориентировочные значения пределов изменения. Даны также ориентировочные значения допустимых пределов изменения откликов, которые необходимо контролировать при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Приведен пример исследования робастности при валидации градиентной методики ВЭЖХ для определения примесей с помощью анализа рисков и метода «one-factor-at-a-time».

ЛИТЕРАТУРА

- United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. 1. – М. 2015.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
- Й. Эрмер, Д.Х. Мак, Б. Миллер. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с. // Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice / Ed. by J. Remer, J.H. Mac, B. Miller. – Wenham: Wiley-VT Verlag GmbH & Co. Ka, 2005. 403 p.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Quality risk management. Q9. – ICH. 2005.
- Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke et al. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2001. V. 24, № 5-6. P. 723–753.
- E. Hund, Y. Vander Heyden, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2002. V. 30. P. 1197–1206.
- B. Dejaegher, Y. Vander Heyden. Ruggedness and robustness testing // J. Chromatography A. 2007. V. 1158. P. 138–157.
- E. Hund, Y. Vander Heyden, M. Haustein et al. Comparison of several criteria to decide on the significance of effects in a robustness test with an asymmetrical factorial design // Analytica Chimica Acta. 2000. V. 404. P. 257–271.
- ГОСТ Р 51901.12-2007 (МЭК 60812:2006). Менеджмент риска. Метод анализа видов и последствий отказов. – М.: Стандартинформ, 2008 (IEC 60812:2006. Analysis techniques for system reliability – Procedure for failure mode and effects analysis (FMEA) (MOD)). URL: <http://www.novsu.ru/file/1202523> (дата обращения 10.12.2017).
- ГОСТ Р ИСО/МЭК 31010-2011. Методы оценки рисков. – М.: Стандартинформ, 2008 (ISO/IEC 31010:2009. Risk management – Risk assessment techniques. (IDT)). URL: http://ivan-shamaev.ru/wp-content/uploads/2013/05/31010-2011_Russia.pdf (дата обращения 10.12.2017).
- Waters e2695 Separations Modules. – Waters. 2008. URL: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002552en.pdf> (дата обращения 10.12.2017).
- European Pharmacopoeia, 9th ed. Chapter 2.2.46. Chromatographic separation techniques. 2017.
- J.A. Illingworth. A common source of error in pH measurement // Biochem. J. 1981. V. 195. P. 259–262.
- Application Bulletin 188/3 e pH measurement technique. Metrohm. URL: http://www.mep.net.au/wpmp/wp-content/uploads/2014/06/MEP_693384_AB-188_3_EN.pdf (дата обращения 10.12.2017).
- B. Patel, S. Roy, H. Ghelani, S. Parmar. Development & Validation of RP-HPLC Method for Estimation of Dabigatran Etxilate Mesylate from Capsule Dosage Form // Intern. J. Pharma Sciences and Research. 2017. V. 8. № 6. P. 142–151.
- Agilent 1200 Series Specification. – Agilent Technologies. 2006. URL: <http://photos.labwrench.com/equipmentManuals/6933-2432.pdf> (дата обращения 10.12.2017).
- Н.А. Эпштейн. О стрессовых экспериментах при разработке / усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т. 3. № 16. С. 54–68.
- Н.А. Эпштейн. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы // Ведомости НЦЭСМП. 2017. Т. 7. № 2. С. 85–91.
- V. Kalyana Chakravarthy, G. Kishore Babu, R. Lakshmana Dasu et al. The role of relative response factor in related substances method development by high performance liquid chromatography (HPLC) // Rasayan J. Chem. 2011. V. 4. № 4. P. 919–943. URL: <http://www.rasayanjournal.co.in/vol-4/issue-4/37.pdf> (дата обращения 10.12.2017).
- Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th Ed. EDQM. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30–32. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf (дата обращения 10.12.2017).
- А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. 2004. № 3. С. 1–15.
- А.И. Гризодуб. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. – Харьков: Украинский научный фармакопейный центр контроля качества лекарственных средств, 2016. С. 47.
- M.I. Jimidar, P. Heylen, M. De Smet. Method Validation // Separation Science and Technology. 2007. V. 8. P. 441–458.
- П.С. Садек. Как избежать ошибок в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Лабораторное пособие / Пер. с англ. И. Дубинского. – М. 2010. (Перевод книги Paul C. Sadek. Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual, John Wiley & Sons, Ltd. 1999).