

# ОФОРМЛЕНИЕ МЕТОДИК ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ВЭЖХ) В СООТВЕТСТВИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМИ РЕКОМЕНДАЦИЯМИ

К.Сычев, к.х.н.  
ИП фирма "СКАН"  
www.uplc.ru

**С**татья посвящена одному из наиболее дискуссионных вопросов в современной аналитике – стандартизации/валидации методик. Автор излагает свой подход к этой весьма актуальной проблеме. Предложен удобный шаблон для оформления ВЭЖХ-методик на русском языке, составленный в соответствии с рекомендациями СИРАС, рассмотрен ряд наиболее спорных вопросов оформления методик, которые нередко вызывают разночтения даже у специалистов в области хроматографии.

## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время оформление аналитических методик на русском языке превратилось в серьезную проблему. Раньше такой проблемы не было, поскольку в стране не было самой аналитики – нельзя назвать полноценной аналитикой ряд ГОСТ по титрометрии и гравиметрии. Аналитика появилась у нас в тот момент, когда рынок насытился хорошими хроматографами и спектрометрами, и эти приборы наконец-то начали применяться в промышленности для контроля качества выпускаемой и покупаемой продукции, а также для экологического контроля.

Итак, аналитика появилась – это был первый этап. Далее, по идее, должны были возникнуть

некоторые административные нормы, которые бы упорядочивали работу разработчиков методик, их контролеров, а также основной массы лабораторий, выполняющих анализы по утвержденным методикам. Только после этого развитие аналитики смогло бы перейти в третью фазу становления правовой базы. Ведь весь смысл проведения анализов заключается в том, чтобы их результаты были в тех или иных рамках легитимны, т.е. имели юридическую силу\*.

Но все неожиданно застопорилось на этапе выработки общих административных норм. Проще говоря – они не вырабатываются. Никто за это не отвечает, бюрократическая система парализована, и в области администрирова-

ния аналитики царит полный хаос. Более того, искусственно созданы максимальные административные барьеры, которые не позволяют аналитикам из государственных и частных предприятий нормально общаться и выработать конструктивные решения. Соответственно, вся система администрирования в аналитике работает максимально непрозрачно и неэффективно. Аналитическая химия как научно-техническая отрасль сейчас вынуждена ориентироваться не на рентабельность, а на соответствие непонятным административным требованиям, которые часто несовместимы со здравым смыслом, и, к тому же, непрерывно меняются. Все это закономерно приводит к огромным финансовым издержкам, которые самым критичным образом сдерживают развитие аналитики. В то же время, с технической точки зрения никакой проблемы выработки административных норм не существует. Все административные нормы давно выработаны и существуют в виде многочисленных рекомендаций различных международных организаций. Основная задача заключается в том, чтобы адекватно перевести эти рекомендации на русский язык.

Проясним некоторые технические моменты, которые вызывают у российских аналитиков наибольшее число вопросов. Как правило, все эти моменты так или иначе связаны с концепцией правильности (официальный термин – пригодности) аналитических методик, основанной на понятии валидации процедуры анализа.

## СТРУКТУРА ДОКУМЕНТА С ТЕКСТОМ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ

Приводимая в данном разделе структура документа с текстом ВЭЖХ-методики в целом основана на авторском русскоязычном переводе рекомендаций СИРАС/4105/R, а именно той их части, где речь идет об оформлении ВЭЖХ-методик: "The Determination of Active Ingredient in Formulated Materials by High Performance Liquid Chromatography" [1].

Почему именно СИРАС/4105/R? Автору и ряду его коллег – химиков-аналитиков – представляется, что именно рекомендации СИРАС соче-

тают простоту и лаконичность, с одной стороны, а также необходимую информационную насыщенность – с другой. Итак, вот общая структура документа:

1. Область применения/действия методики. Структурные формулы целевых веществ (Scope).
2. Краткое описание методики. Подготовка образца и приготовление стандартных растворов (Summary of method).
3. Химические реагенты и материалы (Chemicals).
4. Оборудование и условия хроматографирования. Общий вид хроматограммы. Приготовление подвижной фазы (Apparatus and operating conditions).
5. Критерии пригодности хроматографической системы (Suitability).
6. Требования к параметрам пика(ов) для проведения количественного определения. Проведение количественного определения (Determination).
7. Основные валидационные характеристики. Рекомендации по проведению валидации (Method validation summary).
8. Ссылки на нормативные документы и литературные источники (References).

Подобная структура текста методики очень удобна для аналитика, которому необходимо эту методику воспроизвести. Сначала аналитик уясняет саму суть методики и узнает требуемую конфигурацию хроматографа, затем – требуемые реагенты и тип хроматографической колонки. Когда все готово к работе, он переходит к приготовлению подвижной фазы и далее непосредственно к воспроизведению хроматограммы. После обработки хроматограммы аналитик выясняет, насколько полученное разделение удовлетворяет предъявляемым к нему требованиям. Если полученная хроматограмма не удовлетворяет требованиям методики, то он корректирует условия анализа и делает следующую попытку провести разделение. Когда разделение проведено и все критерии пригодности признаны выполненными, аналитик проводит валидацию методики.

## ИДЕОЛОГИЯ "ВАЛИДАЦИИ" ПРОТИВ "СТАНДАРТИЗАЦИИ"

Концепция пригодности аналитических методик, основанная на понятии валидации процедуры анализа, вызывает сегодня у аналитиков больше всего сопутствующих вопросов, а нередко и возражений. В общих чертах, валидация –

\* К примеру, в нашей стране есть немало лабораторий, имеющих международную аккредитацию. Их результаты признаются в различных странах. Однако все еще остается открытым вопрос, насколько радужно их будущее в нашей стране, в современных условиях "волатильного" законодательства, не основанного на устоявшихся в процессе естественного развития отрасли профессиональных традиций (Прим. авт.).

это проведение серии проверочных процедур, успешное прохождение которых означает пригодность применяемой методики. Другими словами, методика работает, результаты измерения имеют необходимые правильность и прецизионность. Валидацию проводят при внедрении аналитической методики, а также (возможно – частично) каждый раз, когда в процедуру выполнения анализа вносят какие-либо значительные изменения.

В целом, идеология валидации такова: нельзя запретить аналитику адаптировать аналитическую процедуру, если методика в его варианте и исполнении успешно проходит валидацию. Методика носит не запретительный, а рекомендательный характер, она должна помогать аналитику внедрять работающий процесс, а не мешать это делать. В этом моменте заключено основное непонимание концепции "валидации" многими аналитиками и администраторами, которые привыкли к устаревшим и значительно менее эффективным нормам, основанным на идеологии "стандартизации".

Из этого генерального недопонимания, по сути, и возникает вся путаница вокруг оформления методик по международным нормам. Особенно много этой путаницы приходится на формулирование критериев пригодности методик, поскольку они напрямую логически связаны с валидацией. Рассмотрим эти критерии по порядку.

### КРИТЕРИИ ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Критерии пригодности хроматографической системы – это ряд диапазонов допустимого изменения параметров хроматограммы, соблюдение которых, по мнению разработчика, необходимо для успешного прохождения процедуры валидации методики. К параметрам хроматограммы относятся величины, характеризующие хроматографическое разделение: разрешение  $R$  (для пары пиков), селективность  $\alpha$  (для пары пиков), фактор удерживания  $k'$  (для определенного пика), эффективность  $N$  (по определенному пику с определенным фактором удерживания), коэффициент асимметрии  $K_a$  (для определенного пика) [2]. Выполнение критериев пригодности хроматографической системы – это необходимое условие успешного прохождения процедуры валидации, но еще не достаточное.

По "правилам хорошего тона" разработчик методики должен не только указать критерии пригодности хроматографической системы, но и объяснить в деталях, как каждый из критериев рассчитывается. Это совсем не пустые слова, учитывая, что для каждого параметра существует по крайней мере несколько формул, дающих совершенно различный результат. Например, эффективность можно рассчитывать по ширине на половине высоты пика, по ширине и по площади пика; коэффициент асимметрии – на одной десятой или на одной сотой высоты пика; определение фактора удерживания невозможно без инструкции по определению нулевого времени. Кроме того, в формуле расчета разрешения, т.е. наиболее важного параметра разделения, всегда оказывается под вопросом способ определения ширины пика. В чем тут проблема?

Рассмотрим произвольную критическую пару пиков, присутствующую на хроматограмме. Пики могут перекрываться, но область перекрытия должна быть не больше некоторого допустимого предела, величину которого диктует требуемая точность измерения. Разработчику нужно выработать четкое определение минимального разрешения критической пары пиков, при которой перекрытие их площадей будет меньше заданного предела [3]. Ситуация достаточно простая, если пики симметричные. Но что, если пики обладают существенной асимметрией? Тогда выбор критериев пригодности системы усложняется (на первый взгляд).

Кажется, самое простое, что можно придумать, – задать минимальное разрешение пары и максимальный коэффициент асимметрии для первого пика пары. Но даже у такого решения есть два серьезных недостатка. Во-первых, традиционно рассчитываемое разрешение основано на представлении ширины пика как длины отрезка, отсекаемого на базовой линии двумя касательными, проведенными на половине высоты пика. Такая "ширина" в случае асимметричных пиков будет "липовой", т.е. не имеет никакого отношения к реальной ширине пика. Во-вторых, разрешение и асимметрия в данном случае не являются независимыми параметрами. Одинакового разделения можно достичь как при большем разрешении и большей асимметрии, так и при меньшем разрешении, но и меньшей асимметрии [4].

Проблему можно решить, к примеру, если должным образом скорректировать определе-

ние разрешения. Будем считать шириной пика длину отрезка, отсекаемого на базовой линии двумя касательными, проведенными на произвольно выбранной высоте пика. Например, для невысоких и/или не слишком асимметричных пиков – на одной десятой высоты, а для высоких и довольно асимметричных – на одной сотой. Вместо времен удерживания в формулу разрешения подставим значения для середины каждого из отрезков, отмечающих ширину пика (рис.1). Для этого случая обычная формула расчета разрешения

$$R = 2 \cdot (tR2 - tR1) / (w1 + w2) \text{ примет вид}$$

$$R' = 2 \cdot (c2 - c1) / (w'1 + w'2),$$

где  $R'$  – это некоторая новая величина, более адекватно отражающая степень разрешения двух асимметричных пиков;  $w'1$  и  $w'2$  – ширины пиков на произвольной высоте (например, на одной сотой от полной высоты);  $c1$  и  $c2$  – центры отрезков, отсекаемые касательными на базовой линии.

Естественно, введение любых заново определяемых критериев необходимо обосновывать в методике, приводить способ их расчета, иллюстрировать расчет схемой со всеми необходимыми графическими построениями.

И последний вопрос, часто возникающий у аналитиков, воспроизводящих методики: как вообще разработчик методики устанавливает критерии пригодности хроматографической системы? Часть ответа уже приведена. Разрешение применяют в том случае, когда необходимо указать степень разделения пиков критической пары, при которой площадь их перекрытия наверняка меньше предельно допустимой величины. Для слабо удерживаемых компонентов можно указывать минимальное удерживание; для асимметричных пиков – максимальный коэффициент асимметрии. Если важна однозначная последовательность элюирования компонентов, можно указать диапазон варьирования величины селективности разделения двух пиков  $\alpha$ . Наконец, для уширенных пиков, если они не образуют видимых критических пар, можно указывать некоторую минимальную эффективность.

Но откуда берется знание о том, что данные компоненты в приведенных условиях всегда образуют критические пары и что другие компоненты обязательно элюируются в виде асимметричных пиков и так далее? Это можно установить, проведя специальное исследование, т.е. проанализировав много подобных образцов из

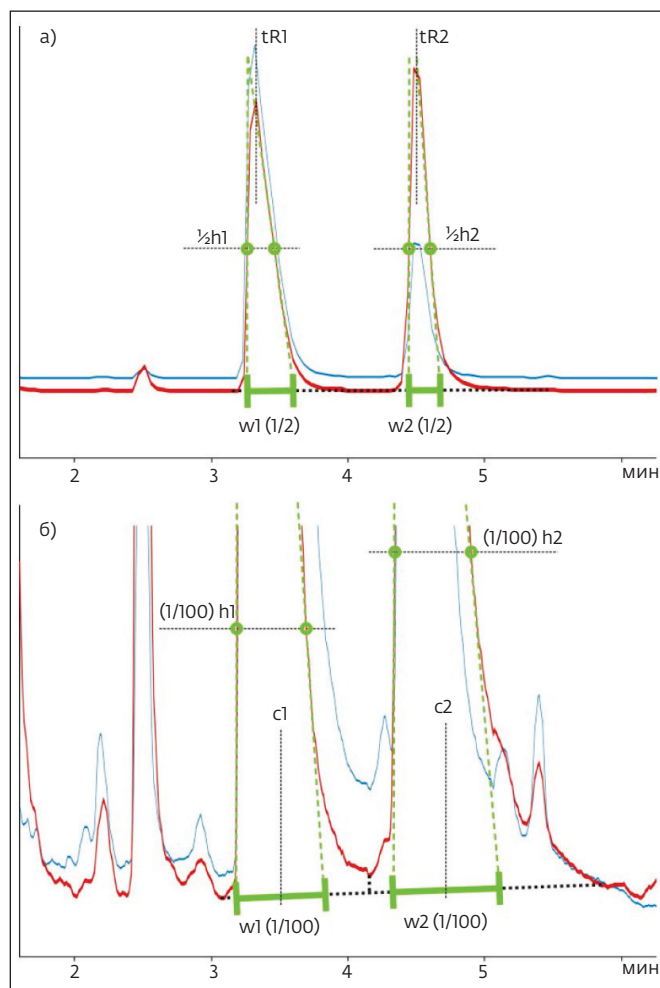


Рис.1. Определение параметров пиков на примере разделения критической пары пиков с высокой асимметрией. Высоты пиков примерно равны; асимметрия на одной десятой высоты,  $K_a(1)=3$ ,  $K_a(2)=2$ : а – хроматограмма на полную высоту пиков; б – хроматограмма на одну сотую от полной высоты пиков внизу. При данном разделении (для пиков примерно равной высоты и приведенных значениях коэффициента асимметрии) перекрытие площадей пиков составляет менее 0,5% (это весьма строгий критерий разрешения). "Классическое" разрешение  $R=1,5$ , скорректированное разрешение  $R'=0,85$

разных источников, обязательно – на нескольких колонках с различающейся селективностью, желательно – при варьировании состава элюента. Варьировать селективность разделения необходимо обязательно: только так можно доказать, что "под" пиками основных компонентов нет никаких других, минорных пиков примесей. Для этих же целей на этапе исследования можно привлекать к анализу ВЭЖХ с МС-детектированием.



Чем обширнее исследование, чем выше квалификация разработчика, тем легче методика воспроизводится. Таким образом, аналитическая методика имеет такое свойство, как "качество". Качественная методика быстро и легко воспроизводится, требует минимум дополнительных усилий по ее адаптации на местах. Отмечу также, что качественные методики всегда обладают высокой устойчивостью (робастностью, надежностью) и хорошо исследованной специфичностью. К слову, эти две характеристики относятся к валидационным, т.е. могут быть включены в протокол валидации. Устойчивость (робастность) означает, что небольшие изменения условий анализа не могут серьезно повлиять на результат хроматографирования. Соответственно, аналитик имеет большой маневр при адаптации методик на месте: может применить иную марку и типоразмер колонки, изменить скорость подачи, скорректировать состав элюента – и все без большого риска ухудшить селективность разделения.

Тщательно исследованная специфичность фактически означает, что на хроматограмме не может "просто так" возникнуть некоторый новый неизвестный пик высокой интенсивности. Подразумевается, что разработчик добросовестно выполнил свою работу и зафиксировал основные компоненты, все возможные примеси, компоненты плацебо (в фармацевтических препаратах), возможные продукты деградации, интенсивные системные пики и так далее. Если существует высокая вероятность появления на хроматограмме неидентифицированных пиков, то действия аналитика должны быть специально оговорены в методике, поскольку речь по сути идет о необходимости коррекции критериев пригодности хроматографической системы.

### **ТРЕБОВАНИЯ К ПАРАМЕТРАМ ПИКОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Достаточное условие успешного прохождения процедуры валидации – выполнение определенного списка требований. На этот раз требования предъявляют непосредственно к параметрам пиков целевых соединений, для которых необходимо провести количественное определение. Чаще всего в методиках можно встретить три вида таких требований: отношение сигнал/шум не менее определенного значения, требование

задать определенные пределы интегрирования пика, удовлетворительную повторяемость значения площади пика (СКО не более определенного значения).

Отношение сигнал/шум, как правило, задают для пиков невысокой интенсивности, например, примесей. При этом подразумевается, что точность их количественного определения вполне может быть не слишком высокой. Отношение сигнал/шум связано с вкладом погрешности измерения площади пика простым соотношением  $\%СКО = 50/SN$ , где  $\%СКО$  – среднее квадратическое отклонение в процентах,  $SN$  – отношение сигнал/шум. Соответственно, на нижнем пределе, т.е. при  $SN = 10$ , СКО составляет  $\pm 5\%$ , что дает доверительный интервал  $\pm 10\%$  при пяти-шести измерениях. Таким образом, для пиков примесей, как правило, ограничиваются требованием  $SN \geq 10$  [5, 6].

Рекомендации по соблюдению определенных пределов интегрирования дают в тех случаях, когда пик целевого соединения имеет значительную асимметрию. Вообще, высокая асимметрия пиков – это очевидный недостаток хроматографического разделения. Площадь асимметричных пиков сложно измерять. В любом случае, для улучшения воспроизводимости ее измерения разработчику следует заблаговременно подобрать подходящие пределы интегрирования пика. Их подбирают постепенным расширением интегрируемой области в направлении "хвоста" пика до тех пор, пока величина его площади не станет сходиться. Это означает, что разница между двумя последовательными значениями площади должна стать меньше некоторой величины, определяемой требуемой точностью определения. Примеры выбора пределов интегрирования, обеспечивающих наиболее точное определение площади, приведены на рис.2.

Наконец, основное требование, предъявляемое, как правило, к пикам основных компонентов, заключается в удовлетворительной повторяемости значения площади пика. Количественно оно выражается как среднее квадратическое отклонение площади пика по результатам нескольких анализов, которое не должно превышать некоторого предельного значения (например, 2 или 5%) [7].

Отдельно отмечу, что выполнение требования удовлетворительной повторяемости без выполнения критериев пригодности хромато-

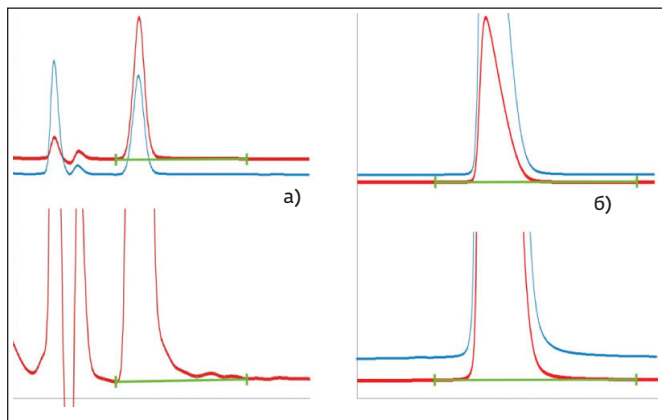


Рис.2. Примеры выбора пределов интегрирования, обеспечивающих наиболее точное определение площади. Погрешность интегрирования не превышает 0,5%: а – случай достаточно симметричного пика (на его "хвосте" сидят пара небольших пиков, которые отделены от основного перпендикулярами), б – случай асимметричного пика ( $K_a = 3$ )

графической системы не имеет смысла. Можно сколько угодно показывать хорошую повторяемость площади пика основного компонента, не разделенного от пика примеси, однако такое определение будет неправильным. Это сразу же выявит надлежащим образом проведенная валидация.

### КАК ДОКУМЕНТАЛЬНО ФИКСИРУЮТ ГИБКОСТЬ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

"Страшная проблема", которая буквально гнетет аналитиков (почитайте любые специализированные форумы и послушайте разговоры в курилках), – это обещание репрессивных мер за отступления от условий хроматографического разделения, указанных в методике. Если что-то вдруг не получается с воспроизведением методики (а такое случается очень часто, поскольку методики в основном сейчас делают кое-как), то аналитик оказывается в ситуации "между молотом и наковальней". Начальство требует внедрить (т.е. валидировать) методику, а химик не может этого сделать, не отступив от условий разделения, приведенных в методике. Здесь нужно четко понимать два обстоятельства:

- если аналитическая процедура успешно проходит серьезную валидацию, несмотря на изменения хроматографических условий, то это и есть работающая (пригодная) аналитическая процедура, и спорить тут больше не о чем;

- если в методике не предусмотрены и не прокомментированы варианты варьирования хроматографических условий разделения – это плохая методика, а человеку, разработавшему такую методику, или выкинувшему такие комментарии из методики, должно быть стыдно перед своими коллегами.

Вот, к примеру, скорость потока. Все понимают, что пока пики делятся (т.е. выполняются критерии пригодности системы), скорость можно увеличивать, насколько позволяет предельное рабочее давление, которое зависит от типа насосной системы. Владелец разбитого одноплунжерного насоса не рискнет работать с давлением больше 150 атм, а оператор установки ВЭЖХ сверхвысокого давления спокойно будет работать при 600 атм, т.е. ему можно работать в четыре раза быстрее. Как методика может запретить ему работать быстрее? Зачем же тогда покупали эту дорогую систему, если нельзя использовать ее основной ресурс?

Просто в методике вместо "Скорость потока 1,5 мл/мин" следует писать: "Скорость потока 1,5 мл/мин. При необходимости скорость потока можно варьировать в любых разумных пределах, пока выполняются критерии пригодности хроматографической системы". И все – проблема решена.

Подобным образом можно описывать и тип хроматографической колонки, например: "150x4.6 Hxxx RP-Amide 3 мкм или аналогичная колонка на основе силикагеля с C16-амидной прививкой, для которой выполняются критерии пригодности хроматографической системы и требования к параметрам пика(ов) для проведения количественного определения". Отмечу, что эта фраза допускает неограниченное варьирование типоразмера применяемой колонки. Действительно, почему бы не позволить аналитику самому выбирать подходящий типоразмер, если он обязуется соблюдать все требования методики, предъявляемые к результату хроматографирования?

### ЧТО ДОЛЖЕН СОДЕРЖАТЬ РАЗДЕЛ ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ

Раздел методики, посвященной валидации, не может включать в себя весь протокол валидации целиком – это невозможно физически. Ведь полный протокол валидации – это самостоятельный и весьма объемный документ. В

тексте методики фиксируются только некоторые избранные моменты из протокола валидации. Весь вопрос в том, какие моменты считать избранными и стоящими того, чтобы упомянуть о них в тексте методики.

Обычно все сходятся во мнении, что в методике следует указывать ее основные валидационные характеристики, характеризующие количественное измерение: диапазон, правильность, повторяемость (иногда воспроизводимость). В случае определения следовых количеств обязательно указывают предел обнаружения [8].

Очень важной характеристикой является специфичность, т.е. возможность провести определение основных компонентов матрицы при наличии в пробе типичных мешающих минорных компонентов: примесей, продуктов деградации. По этой причине в тексте любой методики разумно приводить таблицу с полным перечнем минорных пиков, которые в принципе могут появиться на хроматограмме (включая системные пики). Раздел валидации вполне подходит для размещения подобной таблицы. При этом для минорных пиков необходимо указывать их факторы удерживания (или селективности относительно основных компонентов), а также комментарии об их происхождении. Источник сигнала может быть различным; пик может являться примесью от некоторого компонента, продуктом его деградации или системным пиком. Если разработчик может уверенно идентифицировать источник, его обязательно следует указывать.

Наконец, самое главное: текст аналитической методики обязательно должен содержать рекомендации по проведению валидации. Разработчик должен рассказать, как, по его мнению, имеет смысл валидировать методику, чтобы к результатам анализа было бы сложно придаться аудиторам. Вот тут и начинаются нюансы, которые способны свести на нет всю плодотворность и удобство идеи валидации.

Во-первых, во многих ВЭЖХ-методиках с узкой областью применения (например, в фармацевтике – анализ какого-либо конкретного препарата) подобные рекомендации вообще не приводят. Во-вторых, нередко разработчики методики создают некоторую имитацию, видимость валидационной процедуры, чтобы ее легко было успешно пройти. Например, правильность проверяют методом "вве-

дено-найдено" на холостой пробе или плацебо (при анализе фармацевтических препаратов), т.е. при отсутствии любых мешающих компонентов. Чисто внешне все выглядит хорошо, однако сама проверка получается несерьезной. По идее, правильность и повторяемость надо контролировать не на стандартных растворах основных компонентов, а на типичных образцах, либо на специально приготовленных модельных образцах, содержащих как основные компоненты, так и минорные компоненты, способные помешать количественному определению.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **CIPAC/4105/R.** Guidelines for the Design of Chromatographic Analytical Methods Intended for CIPAC Collaborative Study.
2. **Хроматография. Основные понятия. Терминология.** / Под ред. В.А.Даванкова. Сер. Сборники научно-нормативной терминологии, вып. 114. – М.: Комитет научной терминологии РАН, 1997.
3. **V.R. Meyer. Integration Errors in Chromatographic Analysis.** – LCGC Europe, 1995, Vol. 13, Issue 3, p.252, <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/152006/319792/article.pdf>
4. **J.W. Dolan.** Peak Tailing and Resolution. – LCGC Int., 2002, Vol. 20, p.430, <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/202002/19199/article.pdf>
5. **J.W. Dolan.** The Role of the Signal-to-Noise Ratio in Precision and Accuracy. – LCGC Europe, 2006, Vol. 19, Issue 1, p.12, <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/Column%3A+LC+Troubleshooting/The-Role-of-the-Signal-to-Noise-Ratio-in-Precision/ArticleStandard/Article/detail/284453>
6. **J.W. Dolan.** Calibration Curves, Part II: What are the Limits? – LCGC Europe, 2009, Vol. 22, Issue 4, p.190, <http://www.modernmedicine.com/modernmedicine/article/articleDetail.jsp?id=687751>
7. **Руководство для предприятий фармацевтической промышленности/методические рекомендации.** – М.: Спорт и Культура-2000, 2007.
8. **EURACHEM Guide.** The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.