

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

УДК 543.544:615.07

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ.
ТЕСТ "ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ"**

© 2002 А.Ю.Куликов*, А.Г.Верушкин*

В статье рассмотрены некоторые вопросы, появляющиеся при разработке теста «Проверка пригодности хроматографической системы». В работе даны рекомендации относительно выбора компонентов для раствора для проверки пригодности хроматографической системы и представлены рекомендуемые требования для данного теста. Рассмотрены дополнительные параметры теста пригодности системы.

Термин «Пригодность системы» (*System suitability*) применительно к жидкостной (ВЭЖХ) и газовой (ГЖХ) хроматографии впервые был введен в фармакопею США (USP) XXI издания. Затем тест «Пригодность системы» появился как в других фармакопеях, так и в нормативно-аналитических документах и научных публикациях [1]. В данной работе мы не будем касаться Государственной фармакопеи Украины, которая в основном является переводом и частичной адаптацией к условиям Украины фармакопеи Европы, а будем рассматривать сам первоисточник – фармакопею Европы (ЕР).

Ранее [2] нами уже рассматривались некоторые общие вопросы применения данного теста и были даны рекомендации касательно выбора колонок, аналогичных приведенным в методике, используя тест "Проверка пригодности хроматографической системы". Однако, как показала практика и многочисленные нормативно-аналитические документы, в которых широко используется метод ВЭЖХ (в данной статье будет рассматриваться только этот метод в сочетании со спектрофотометрическим детектором), аналитик не полностью осознает важность данного теста, содержание которого зачастую сводится к его простому написанию.

Основная цель теста "Пригодность хроматографической системы" – подтверждение соответствия текущего анализа тем условиям, в которых данная хроматографическая методика прошла валидационную процедуру при утверждении нормативно-аналитической документации [3]. Поэтому этот тест, с одной стороны, защищает потребителя, охраняя его от пропущенного брака, с другой стороны – защищает производителя при проверке качества лекарственной субстанции и лекарственного средства. Аналитик, разрабатывающий методику анализа, должен написать тест "Проверка пригодности хроматографической системы".

Именно здесь и начинаются все проблемы, потому, что аналитик зачастую не понимая важность теста "Проверка пригодности хроматографической системы" выбирает пики и их характеристики наугад, не задумываясь о правильности выбора и соответствуя требованиям теста и метода, для которого данный тест используется (количественное определение или определение примесей). Кроме того, ни в одном нормативном документе или фармакопее не даны рекомендации о том, как правильно выбирать показатели для теста "Проверка пригодности хроматографической системы".

В данной статье на конкретных примерах мы рассмотрим основные проблемы, связанные с данным тестом и попытаемся дать пути из решения.

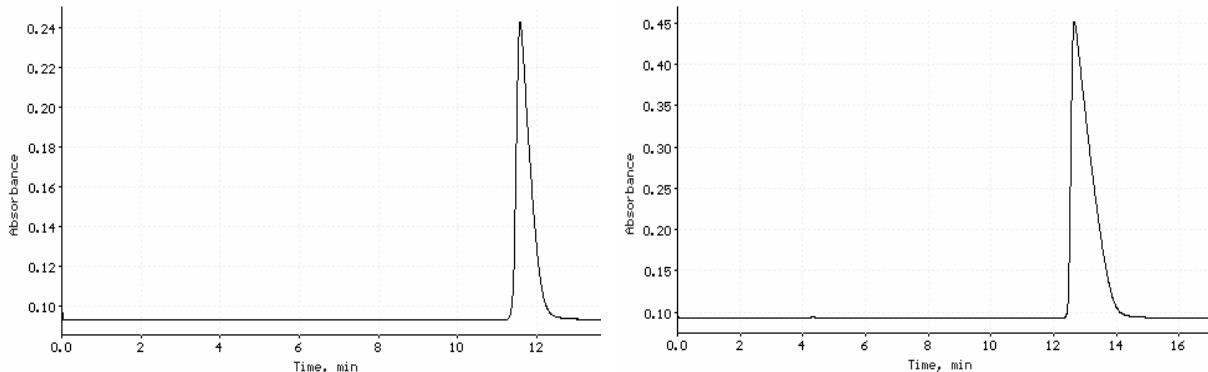
Характеристика основных критериев теста "Проверка пригодности хроматографической системы"

1. *Эффективность хроматографической колонки.* Эффективность хроматографической колонки рассчитывается по пику определяемого компонента или по пикам определяемых компонентов, будь то основное вещество или примесь.

* Научно-экспертный фармакопейный центр, г.Харьков

При количественном определении практически никаких проблем не возникает. При данном определении количество вводимого вещества на колонку оптимально (0.2-2 мкг). В результате пик получается узким и симметричным, и для него обычно характерно высокое значение числа теоретических тарелок.

При определении посторонних примесей определение эффективности колонки по пику основного вещества является неправильным. В данном случае на колонку вводится заранее большое количество вещества (20-100 мкг и более). При этом пик, как правило, асимметричен из-за перегрузки колонки, и эта асимметрия сильно влияет на величину эффективности колонки (рис.1).



Число т.т. – 5324, асимметрия пика 1.95 Число т.т. – 1795, асимметрия пика 3.67
Рис.1. Хроматограмма, показывающая зависимость формы пика от количества вводимого на колонку вещества: оптимальная нагрузка на колонку (хроматограмма слева); перегруз колонки (хроматограмма справа). Под рисунком приведены эффективность колонки (в теоретических тарелках – т.т.) и асимметрия пика.

Поэтому при определении посторонних примесей возможно два варианта определения эффективности колонки: либо по пику разбавленного (примерно 1:100) основного компонента, либо по пику определяемой примеси (если примесь определяется по стандартному образцу примеси).

2. Асимметрия хроматографического пика. Выбор пика, для которого необходимо проводить определение асимметрии, аналогичен выбору пика для определения эффективности колонки.

Однако следует отметить, что данный параметр необходимо рассматривать в совокупности со степенью разделения пиков и точностью определения.

3. Точность (СКО). Данный показатель рассматривался достаточно подробно [4]. В USP отмечается, что для пяти параллельных определений относительное стандартное отклонение должно быть не более 2%; для шести – более 2% [5] и эти данные могут быть применены только для теста пригодности для количественного определения. При определении, например, примесей, концентрация которых на порядки меньше концентрации основного вещества, относительное стандартное отклонение может быть гораздо больше – 5% или даже 10%.

4. Степень разделения пиков.

Прежде чем рассмотреть вопрос о выборе компонентов, для которых нужно будет определять степень разделения, необходимо поставить ряд вопросов и ответить на них:

Для каких пиков необходимо определять степень разделения? — Для близко расположенных друг к другу пиков или для пика основного вещества и его примеси(ей) (вспомогательных веществ).

Как следует выбирать вещества, для которых впоследствии будет производиться расчет степени разделения? — Наиболее приемлемыми и правильными являются вещества, пики которых близко расположены друг к другу и чутко реагирующие на малейшее изменение в хроматографической системе. Чаще всего такими веществами являются изомеры, полупродукты синтеза или продукты разложения субстанции, вещества похожей структуры.

Если ответы на данный вопрос были достаточно однозначны, то на вопрос "Какую концентрацию должны иметь вещества, используемые для определения разделяющей способ-

"ности?" существует два варианта ответа: Вариант первый и наиболее правильный: для определения разделяющей способности вещества должны иметь ту же концентрацию, которую они имеют в испытуемом растворе препарата. Но зачастую применяется второй вариант: используется раствор для проверки пригодности хроматографической системы, в котором два используемых (определяемых) вещества имеют одинаковую концентрацию (около 0.1-1.0 мкг в 10 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы).

Рассмотрим на конкретных примерах оба встречающихся варианта при определении степени разделения двух веществ в teste "Проверка пригодности хроматографической системы".

Пример 1. Трамадола гидрохлорид (рис.2). [6]

При определении посторонних примесей в субстанции трамадола гидрохлорида с использованием метода ВЭЖХ разделяющую способность определяют для пиков цис- (неактивное вещество) и транс- (лекарственная субстанция) изомеров трамадола гидрохлорида. При этом содержание цис-изомера трамадола гидрохлорида регламентируется от 0.1-0.5% в лекарственной субстанции, до 1% в готовых лекарственных формах.

При приготовлении раствора для проверки пригодности хроматографической системы используется первый из описанных нами, вариантов, и, как показывают многочисленные исследования, наиболее правильный (рис.3, верхняя хроматограмма). При этом в требованиях теста указывают, что "степень разделения пиков цис-изомера трамадола гидрохлорида и трамадола гидрохлорида, рассчитанная из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы, должна быть не менее 1.2. Для достижения указанной степени разделения допускается корректировка состава подвижной фазы".

Выбор данных веществ был сделан корректно, так как любое незначительное изменение в хроматографической системе (изменение состава подвижной фазы или типа колонки) сразу же оказывается на степени разделения изомеров и, как следствие, на достоверности получаемых результатов.

При использовании в данном примере второго варианта (рис.3, нижняя хроматограмма) для приготовления растворов (одинаковые концентрации изомеров) степень разделения пиков значительно увеличивается (примерно 1.4-1.6) и в данном случае незначительное изменение в хроматографической системе не так сильно скажется на степени разделения. Другими словами, если колонка длительно использовалась в хроматографическом анализе или аналогична указанной в нормативно-аналитическом документе [6], то при хроматографировании такого раствора для проверки пригодности хроматографической системы значительных изменений в степени разделения мы можем не получить.

Однако, при достаточном разделении в 1.4-1.5 между изомерами при их одинаково малой концентрации для неперегруженной колонки при введении испытуемого раствора

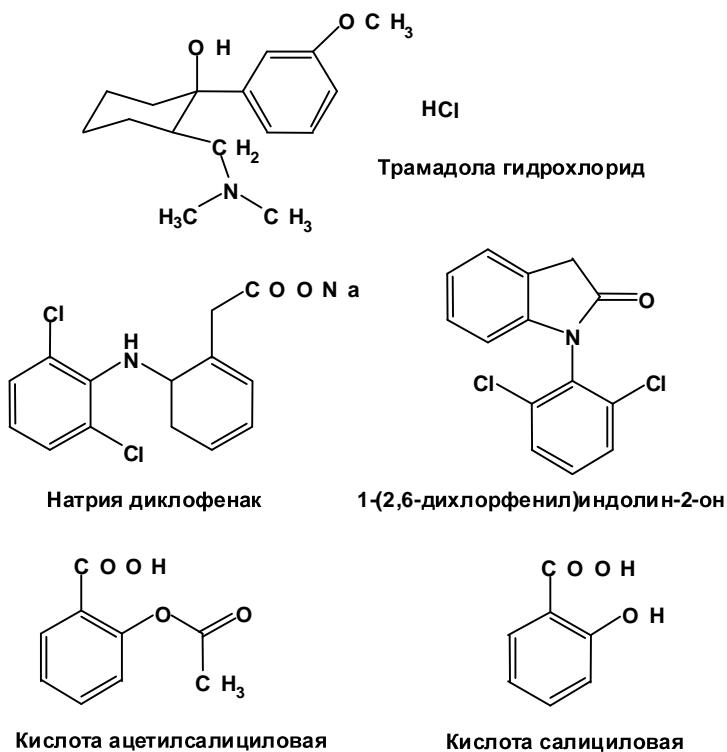


Рис.2. Структурные формулы веществ, рассматриваемых в примерах на степень разделения пиков.

(значительный перегруз по транс-изомеру трамадола гидрохлорида – 20 мкг на колонку) возможно слияние пиков изомеров.

Следовательно, при определении пригодности хроматографической системы по разделению изомеров необходимо готовить раствор для проверки пригодности хроматографической системы в концентрациях компонентов, соответствующих концентрациям в испытуемом растворе.

Однако следует отметить, что если вещество состоит из равных долей изомеров (например, D-норгестрел и L-норгестрел), то в растворе для проверки пригодности хроматографической системы при его использовании для количественного определения необходимо создать такую концентрацию компонентов, которая вписывается в оптимальный допустимый диапазон нагрузок на колонку. При определении же посторонних примесей в данном случае необходимо подбирать другое вещество для проверки разделяющей способности системы.

Пример 2. Диклофенак натрия (рис.2).

Для рассмотрения разделяющей способности в тесте «Проверка пригодности хроматографической системы» для субстанции натрия диклофенака и его примеси A (1-(2,6-дихлорфенил)индалин-2-он) обратимся к ЕР [7]: «На хроматограмме для раствора для проверки пригодности хроматографической системы время удерживания для пика диклофенака натрия должно быть около 25 мин и для примеси A диклофенака должно быть около 12 минут. Тест «Пригодность хроматографической системы» считается не выполненным, если степень разделения между указанными пиками менее 6.5».

В растворе для проверки пригодности хроматографической системы используется диклофенак натрия и его примесь A в одинаковых концентрациях (1 мкг). Данные концентрации веществ подходят для раствора для проверки пригодности хроматографической системы (рис.4), но возникает вопрос о целесообразности введения степени разделения для данных веществ в тест «Проверка пригодности хроматографической системы».

Во-первых, незначительные изменения в хроматографической системе, на которые должен реагировать данный тест, в указанном варианте ни к чему не приведут. То есть могут произойти изменения в системе, если хроматографист использует в анализе хроматографическую колонку, в которой более 70% привитых октильных групп смыто в результате предыдущих анализов. Только тогда возможно значительное сближение и слияние пиков диклофенака и его примеси.

Как показали многочисленные исследования в Лаборатории Фармакопейного анализа (ЛФА) Фармакопейного комитета Украины, при переходе от одного типа сорбента к другому (Nucleosil C8, Hepersil C8, Zorbax C8, NovaPak C8) никаких изменений в системе не происходит. Следовательно, данный тест может не учитывать изменения в колонке и не позволяет вносить корректизы в систему. Напротив, в ЛФА имеются многочисленные данные, что если время удерживания диклофенака натрия будет не 25 минут, а около 12 минут (для примеси A – около 6 минут), то данные по примесям, которые получаются в такой хроматографической системе, полностью совпадают с данными, получаемыми при полном воспроизведении условий ЕР.

Из всего вышесказанного видно, что параметр разделения в данном варианте в таком виде, в каком он представлен в ЕР, практически не нужен. Он лишь частично усложняет и удлиняет анализ, но не позволяет следить за состоянием хроматографической системы во время анализа.

Пример 3. Ацетилсалicyловая кислота (рис.2).

В примере 1 мы рассматривали случай, когда определяемая примесь при хроматографировании выходит перед основным пиком. В данном примере мы рассмотрим случай, когда примесь выходит за основным пиком.

Обратимся к статье фармакопеи Европы «Кислота ацетилсалicyловая» [8].

«Испытуемый раствор. Растворить 0.10 г анализируемой субстанции в ацетонитриле для хроматографии Р и разбавить до объема 10.0 мл тем же растворителем.

Раствор для сравнения (b). Растворить 10.0 мг салициловой кислоты Р в подвижной фазе и разбавить до объема 10.0 мл подвижной фазой. К 1.0 мл полученного раствора прибавить 0.2 мл испытуемого раствора и разбавить до объема 100.0 мл подвижной фазой.

Хроматографировать 10 мкл каждого раствора. Тест «Проверка пригодности хроматографической системы» не считается пригодным, если на хроматограмме раствора для сравнения (b) степень разделения двух основных пиков по крайней мере **6.0**.

Хроматографическая колонка – 250*4.6 мм, заполненная октадецилсиликагелем для хроматографии Р (5 мкм) (в [9] указано Nucleosil C18). Подвижная фаза – кислота фосфорная Р – ацетонитрил для хроматографии Р – вода Р (2:400:600).»

Рассмотрим хроматограмму, полученную в полном соответствии с условиями ЕР. На хроматограмме (рис.5) раствора для сравнения (b) степень разделения пиков салициловой и ацетилсалициловой кислот (0.1 мкг и 0.2 мкг в 10 мкл пробы, соответственно) около **4.5**. Однако при хроматографировании испытуемого раствора (100 мкг кислоты ацетилсалициловой в 10 мкл пробы), как видно из наложенных хроматограмм (рис.6), салициловая кислота практически не отделяется от ацетилсалициловой.

Если бы раствор для проверки пригодности хроматографической системы был сделан правильно, то есть ацетилсалициловой кислоты в 10 мкл пробы было бы 100 мкг, а салициловой кислоты 0.1 мкг, то для получения степени разделения пиков кислоты салициловой около **8** необходимо содержание ацетонитрила в подвижной фазе уменьшить до **20%** (рис.7). Условие, что хроматографирование необходимо проводить в **7** раз дольше времени удерживания основного пика осталось бы неизменным для получения данных обо всех примесях.

Данный пример наглядно показывает неадекватность теста «Проверка пригодности хроматографической системы» условиям хроматографирования и полученным результатам: в данных условиях примесь кислоты салициловой определить невозможно.

Рассмотренные выше критерии являются основными для теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Однако в ведущих фармакопеях мира и в монографиях на контроль качества лекарственной субстанции методом ВЭЖХ, например [10], используются еще ряд показателей.

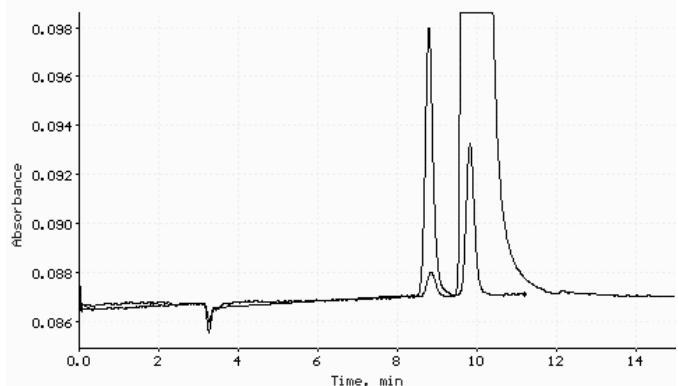


Рис.3. ВЭЖХ-хроматограмма, полученная для трамадола гидрохлорида в тесте «Цис-изомер трамадола гидрохлорида».

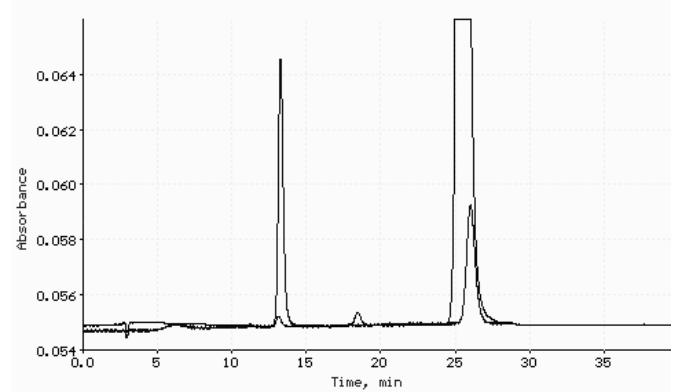


Рис.4. ВЭЖХ-хроматограмма, полученная для натрия диклофенака в тесте «Посторонние примеси» по методике ЕР [7].

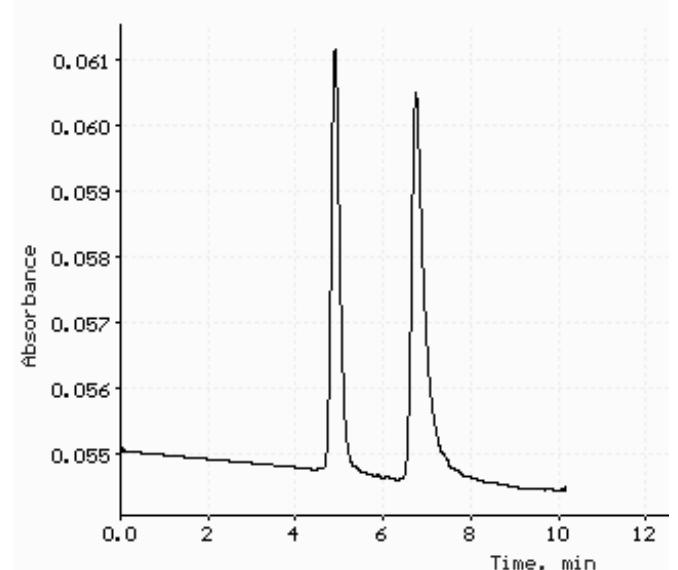


Рис.5. ВЭЖХ-хроматограмма раствора для сравнения b, полученная в тесте «Посторонние примеси» для кислоты ацетилсалициловой по методике ЕР [8,9].

1. Соотношение сигнал-шум (**S/N**) — вычисляется как отношение удвоенной высоты пика определяемого компонента к абсолютной величине наибольшей флюктуации шума базовой линии, полученной из хроматограммы после инжекции подвижной фазы, или как величина, полученная путем измерения флюктуации шума на отрезке хроматограммы, равной удвадцатеренной величине ширины определяемого пика на его полувысоте, полученной из хроматограммы для определенного описанного стандартного раствора и находящейся на равных расстояниях по обе стороны от определяемого пика (рис.8).

Данное соотношение вводится в случае количественного определения примесей, когда их содержание либо очень мало, либо когда чувствительность детектора при данной длине волны к данному компоненту низкая.

2. Отношение высота пика/ глубина (высота) седловины [11,12]. Данное отношение является еще одним способом определения степени разделения пары смежных пиков на хроматограмме. Рис.9 характеризует определение отношения, связывающего высоту пика с глубиной седловины между двумя пиками. Этот критерий можно вычислить по формуле:

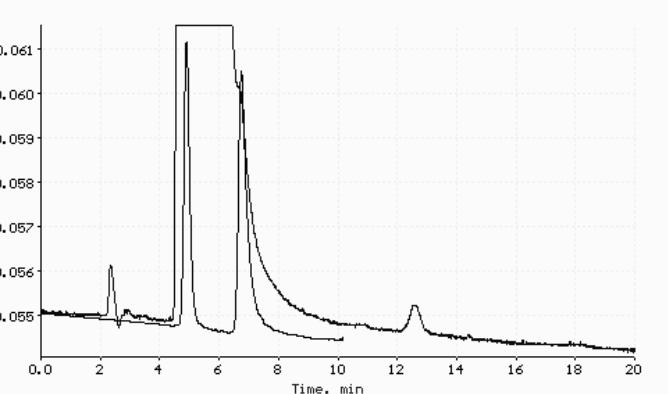


Рис.6. ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора кислоты ацетилсалициловой, полученная в тесте «Посторонние примеси» для кислоты ацетилсалициловой по методике ЕР [8,9].

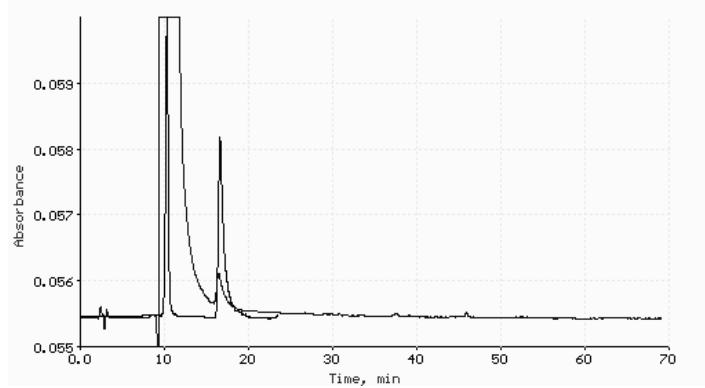


Рис.7. ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора кислоты ацетилсалициловой и раствора для сравнения b, полученная в тесте «Посторонние примеси» для кислоты ацетилсалициловой по методике ЕР [8,9] при содержании ацетонитрила в подвижной фазе 22%.

где g — интерполированная высота пика, то есть высота, равная расстоянию от нулевой линии до линии, соединяющих вершины двух пиков и проходящей над седловиной; f — глубина седловины относительно интерполированной нулевой линии.

$$P = f / g,$$

где g — интерполированная высота пика, то есть высота, равная расстоянию от нулевой линии до линии, соединяющих вершины двух пиков и проходящей над седловиной; f — глубина седловины относительно интерполированной нулевой линии.

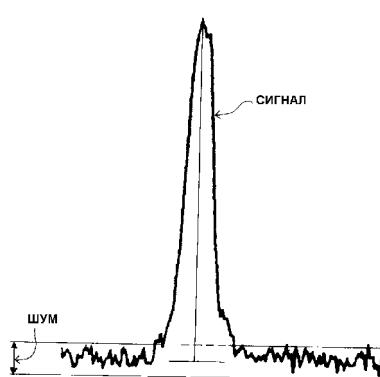


Рис.8. Определение соотношения сигнала/шума (S/N) [10-12].

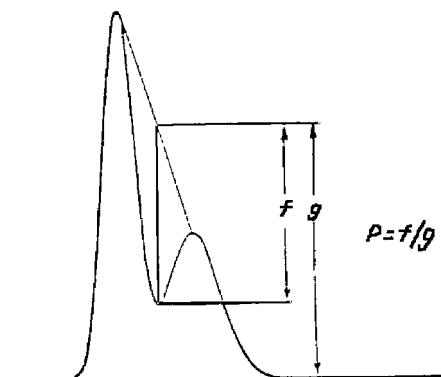


Рис.9. Определение отношения высота пика/глубина (высота) седловины [11,12].

Отношение высота пика/ глубина (высота) седловины изменяется от нуля (седловина отсутствует) до единицы (при полном разделении). Следует отметить, что разделение P , равное нулю, не обязательно означает, что два разделяемых компонента элюируются с одним и тем же временем удерживания. Существует порог разделения, ниже которого присутствие двух индивидуальных полос в одном пике приводит только к уширению или искажению формы пика без проявления седловины.

Данный критерий рекомендуется применять вместо степени разделения R_S в том случае, когда невозможно определить значения ширины пиков на полувысоте (рис.10А), которые необходимы для расчета степени разделения.

3. Относительные времена удерживания. Данный параметр может как входить в тест "Проверка пригодности хроматографической системы", так и существовать отдельно внутри хроматографической методики. В случае анализа многокомпонентной смеси относительные времена удерживания лучше указывать после условий хроматографирования. В случае же определения посторонних примесей относительные времена удерживания лучше указывать внутри теста "Проверка пригодности хроматографической системы" как еще один критерий проверки хроматографической системы.

Относительные времена удерживания рассчитываются для пиков определяемых компонентов по отношению времени удерживания n -го пика либо ко времени удерживания пика внутреннего стандарта (который необходимо дополнительно вводить в анализируемый раствор), либо по отношению ко времени удерживания пика основного компонента испытуемого раствора (зачастую это используется при определении посторонних примесей), либо по отношению ко времени удерживания последнего пика в группе пиков, присутствующих в анализируемом растворе.

Рекомендуемые требования к тесту "Проверка пригодности хроматографической системы"

Дать общие требования к критериям теста "Проверка пригодности хроматографической системы", которые могут быть характерны для всех возможных случаев, довольно затруднительно. Аналитик, разрабатывающий ВЭЖХ-методику, должен сам, руководствуясь принципом необходимости и достаточности, определиться с величинами критериев теста. Если достаточная эффективность колонки для данного анализа будет 500 теоретических тарелок (и это будет показано в соответствующих валидационных процедурах), то данная величина и будет той оптимальной, которую необходимо включать в соответствующий раздел теста.

Значения основных параметров, характеризующих тест "Пригодность хроматографической системы" [13-15], могут быть следующими:

- Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику определяемого вещества из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической

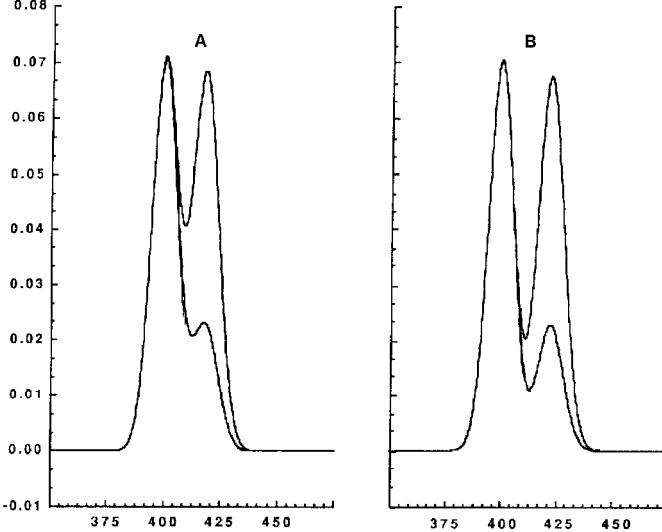


Рис.10. Рисунки, показывающие степень применения критериев степени разделения пиков и отношение высота пика/ глубина (высота) седловины [12]. А – использование критерия отношения высота пика/ глубина (высота) седловины (невозможно определить ширину пика на полувысоте). В – возможно использование либо критерия степень разделения пиков, либо критерия отношение высота пика/ глубина (высота) седловины.

системы (раствора стандартного образца) должна быть не менее **1000** теоретических тарелок.

- Фактор асимметрии пика, рассчитанный по пику определяемого вещества из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствора стандартного образца), должен быть в пределах: от **0.9** до **1.2** (идеальный пик); от **0.8** до **1.6** (почти идеальный пик, оптимальные значения); не более **2.0** – предельно допустимое значение асимметрии пика для вычислений при количественном определении.
- Относительное стандартное отклонение, рассчитанное для пика определяемого вещества из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (испытуемого раствора, раствора стандартного образца), должно быть не более: **1-2%** при количественном определении; **5-10%** при определении посторонних примесей на уровне **100 ppm (0.01%)**.
- Степень разделения пиков, рассчитанная для двух близкорасположенных пиков из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (испытуемого раствора), должна быть не менее **1.0** (при степени перекрывания пиков не более **5.0%**); не менее **1.5** (при степени перекрывания пиков не более **0.1%**); а в целом не более **4.0**.
- Дополнительно в тесте «Проверка пригодности хроматографической системы» могут указываться следующие параметры:
- Соотношение сигнал-шум, рассчитанное для пика определяемого вещества из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствора стандартного образца) должно быть не менее **3.0**.
- Отношение высота пика/ глубина (высота) седловины, рассчитанное для двух близко расположенных пиков из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (испытуемого раствора), должно быть не менее **0.7** (практически соответствует степени разделения около **1.0**).
- Относительные времена удерживания, рассчитанные из хроматограмм раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствора стандартного образца) должны составлять: например для пика 1 около **0.12**; для пика 2 около **0.25**; для пика, по которому проводят расчет относительного времени удерживания – **1**.
- Высота пика определяемого компонента на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы должна быть не менее **50%** (или иная величина) полной шкалы регистрирующего прибора.

Значения критериев, которые выходят за рекомендуемые пределы, должны обосновываться на стадии утверждения нормативно-аналитического документа (валидация аналитической методики).

Литература

1. Cox R., Menon G. Pharmeuropa. 1998. V.1. No.1. P.136
2. Куликов А.Ю., Верушкин А.Г., Шкляев С.А. Фармаком. 2001. №1. С.47-56.
3. Левин М.Г., Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А. и др. Фармаком. 1996. №1/ 2. С.16-29.
4. М.Г.Левин, А.И.Гризодуб, Д.А.Леонтьев, Н.Н.Асмолова, А.Ю.Куликов, В.П.Георгиевский. Фармаком. 1996. №3. С.12-22.
5. USP 24/ NF 19. The United States Pharmacopeia and National Formulary. Official from 1.01.2000. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. 1999. 2563 р.
6. Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe (DAB 10). Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart Govi-Verlag GmbH Frankfurt. 1992. Band 1-4.
7. Diclofenac sodium. European Pharmacopoeia 1997. Third edition. Council of Europe. Strasbourg. P.1487-1488.
8. Acetylsalicylic acid. European Pharmacopoeia Supplement 2000. Third edition. Council of Europe. Strasbourg. P.334-336
9. Acetylsalicylic acid PA/ PH/ Exp. 10A/ T (97) 104. In European Pharmacopoeia Comission. PA/PH/Exp. 3/T (98) 119, COM

10. Cyanocobalamin. European Pharmacopeia 1997. Third edition. Council of Europe. Strassbourg. P.691-692
11. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. 1989. М.: Мир, 399 с.
12. Lough W.J., Wainer J.W. HPLC. Fundamental principles and practice. 1996. London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melburn-Madras. 270 р.
13. МУ ФК-1-96 "Индивидуальные лекарственные вещества и готовые лекарственные средства". Приложение 1. Фармаком. 1996. № 4/ 5 С.7-19.
14. МУ ФК-1-96 "Индивидуальные лекарственные вещества и готовые лекарственные средства". Приложение 2. Фармаком. 1996. № 6 С.10-22.
15. МУ ФК-1-96 "Индивидуальные лекарственные вещества и готовые лекарственные средства". Приложение 3. Фармаком. 1996. №7 С.12-21.

Поступила в редакцию 6 ноября 2002 г.

Kharkov University Bulletin. 2002. №549. Chemical Series. Issue 8(31). A.Yu.Kulikov, A.G.Verushkin. High-performance liquid chromatography in pharmaceutical analysis. System suitability test.

In this article some problems, appearing in developing of the chromatographical system suitability test are considered. Recommendations concerning selection of solution components for system suitability test are given and the recommended requirements for the given test are presented. The additional parameters for the system suitability test are considered.