УДК 615.07:54.062:543. 422

**О.Л. Левашова, асистент, канд.фарм.наук**

*Харківський національний медичний університет*

*пр. Леніна 4, г. Харків, Украйна, 61022*

*E-mail: lev-26@list.ru*

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У ФАРМАЦЕВТИЧНИХ КОМПОЗИЦІЯХ**

Кількість лікарських засобів, мультивітамінних препаратів, біологічно активних та харчових добавок, з кожним роком збільшується. Зростаючі вимоги до безпеки, ефективності та якості лікарських препаратів, БАДів обумовлюють необхідність розробляти нові і удосконалювати існуючі методи їх аналізу.

Для того, щоб аналітична методика зайняла гідне місце в системі забезпечення якості, відповідала своєму призначенню, тобто гарантувала достовірні і точні результати аналізу, передбачена процедура валідації аналітичних методик. Практика валідаційних експериментів дає розуміння суті методики і усвідомлення необхідності строгого дотримання її параметрів. Слід відзначити, що питання розробки, верифікації і валідації методик контролю якості мультивітамінних препаратів і БАДів практично не вивчалися в вітчизняній літературі. Це пов’язано, передусім, зі значною складністю цих об’єктів – вони містять велику кількість мікроелементів, водо- і жиророзчинних вітамінів у низьких концентраціях, які є дуже чутливими до хімічних і фізичних чинників і умов зберігання. Сьогодні розробка і стандартизація процедури проведення валідації аналітичних методик контролю якості та безпеки лікарських засобів є важливою проблемою як для підприємств, так і розробників АНД

Об’єктами дослідження були методики кількісного визначення мікроелементів з використанням різних методів вилучення мікроелементів із складної матриці фармацевтичних композицій.

Ціль експериментальних досліджень - довести, що методика дозволяє достовірно контролювати кількісний вміст мікроелементів в препаратах.

Вибір аналітичних методик завжди здійснюється в рамках поставленого завдання і, як правило, обмежений рамковими умовами (кількість зразка, допустимий час аналізу, наявність аналітичного обладнання, необхідна точність аналізу та ін.). Тому, аналіз мікроелементів проводили методом атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС), якийвідрізняється високою вибірковістю і чутливістю. Вимірювання проводили на спектрометрі атомної абсорбції Varian 220 FS Double Beam AA (USA), забезпеченому лампою з порожнистим катодом специфічною для відповідного елементу.

Пробопідготовка – одна з найважливіших стадій аналітичних методів, основним завданням якої є кількісний переніс елементів в розчин, виключення втрат летючих компонентів, усунення контакту аналітиків з агресивними речовинами і раціональне поєднання з інструментальними методами. Стадія пробопідготовки є дуже важливою в процесі аналізу ААС і часто вносить основну погрішність до результату аналізу, лімітує тривалість аналізу і його метрологічні параметри. Особливо це відноситься до багатокомпонентних препаратів зі складною органічною матрицею.

Так, для визначення заліза досліджуваний зразок (розтерті таблетки мультивітамінного препарату) піддавалисухому озоленню, при якому відбуваються повне окислення і видалення органічної основи проби з подальшим відновленням у НСl та розбавленням. Озолення зразків дозволяє сконцентрувати незначний вміст заліза в препараті. Для стандартизації методу визначення заліза був отриманий і досліджений атомний спектр поглинання при довжині хвилі 248.3 нм в повітряно-ацетиленовому полум'ї, залежність атомної абсорбції від концентрації досліджуваного розчину визначали по калібрувальному графіку.

При аналізі Ca та Zn використовували кислотну екстракцію. Для уникнення інтерференції заліза і других мікроелементів використовували розчин хлориду лантану. Крім того, при визначенні Са, що утворює важко дисоціюючи сполуки, використовували високотемпературне полум'я (3000-3200ºС), суміш N2О/ацетилен. Визначення Ca та Zn проводили з використанням калібрувального графіку аналогічно визначенню заліза.

В ході досліджень була розроблена аналітична методика кількісного визначення мікроелементів у фармацевтичних композиціях методом ААС з використанням калібрувального графіку [1].

Відповідно до вимог ДФУ[2,3] та ЄФ [4], які гармонізовані з вимогами ICH, всі методики контролю якості ЛЗ повинні бути відвалідовані. Валідація аналітичної методики забезпечує необхідний доказ, що методика є придатна для цільового використання, тобто буде гарантувати, що результати аналізу надійні, послідовні та існує ступінь довіри результатам. Проте в даних документах та різних керівництвах з валідації [5, 6] викладаються лише загальні принципи валідації методик різних аналітичних методів. Крім того, не зустрічається систематизованої процедури та науково обґрунтованих критеріїв придатності валідаційних характеристик, що пов’язані з вимогами до невизначеності результату аналізу фармацевтичних випробувань. У ДФУ відсутні валідаційні критерії прийнятності щодо методик ААС з використанням калібрувального графіку.

Валідацію аналітичної методики проводили за наступними показниками: точність, специфічність, лінійність, діапазон вимірювання, прецизійність, внутрішньолабораторна точність, робастність. Для практики валідації аналітичних методик все ж таки недостатньо тільки описів параметрів, методології їх  їх визначень, способів виразу (те, що дають фармакопейні документи). Необхідна також інформація про  те, як організувати процес, оптимізувати дослідження і вибирати числові критерії, на якому етапі розробки методики проводити валідацію і т.д. У цьому істотну допомогу надають додаткові офіційні документи і публікації різних авторів і організацій [7].

Тому, планування експерименту проводили так, щоб відповідні валідаційних характеристик (специфічність, діапазон застосування, правильність і прецизійність) вивчалися одночасно. Для цього для кількісних випробувань було вивчено 9 точок в межах досліджуваного діапазону методики. Для оцінки правильність і прецизійність використовували всі результати, отримані при вивченні лінійності. Для оцінки правильність і прецизійність використовували відношення «знайдено:введено», у відсотках, (Zi): Zi = Yi / Xi · 100% Точність оцінювалася на основі аналізу зразка з відомою концентрацією і порівняння вимірюваної величини з істинним значенням, що входить до складу матеріалу. Внутрішньолабораторну точність визначали за допомогою аналізу модельних  розчинів препарату в різні дні й оцінки різниці знайденого вмісту мікроелементів. Робастність оцінювали при аналізі стабільності розчинів та відтворюваності результатів при використанні іншого обладнання.

Були також розраховані критерії прийнятності метрологічних характеристик для методики кількісного визначення заліза методом ААС з використанням калібрувального графіку. Так, при визначенні критеріїв прийнятності лінійності перевірялась коректність використання лінійної моделі калібрування. Були розраховані та перевірені параметри лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації:

* залишкове стандартне відхилення SD0 (SDo ≤ 0.53 %)
* коефіцієнт кореляції R (Rc ≥ 0.99912 )

Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні використання методики. Вивчення залежності абсорбції від концентрації проводили з використанням 9 модельних сумішей із вмістом заліза: 50.0, 62.5, 75.0, 87.5, 100.0, 112.5, 125.0, 137.5 і 150.0% від номінального вмісту (28.7 мг/таб). Для калібрування готували 5 стандартних розчинів в діапазоні 50-150% (тобто маємо 3 міри свободи) з концентрацією заліза: 50.0, 75.0, 100.0, 125.0 і 150.0% від номінального вмісту заліза в препараті, що відповідає *Cst,i* = 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 і 6.0 ppm в кінцевому розчині. Нами було вивчено лінійну залежність концентрації (мг/мл або ррм) від абсорбції (табл.3). Результати величин Сi та Аi були оброблені методом найменших квадратів.

Таким чином, обґрунтовані і створені підходи проведення валідації методики, яка одночасно придатна для випробувань кількісного визначення та розчинення мікроелементів методом атомної абсорбції відповідно до найширшого діапазону застосування та більш критичних вимог до максимально припустимої невизначеності методики аналізу .

Розроблені аналітичні методики кількісного визначення мікроелементів апробовані в аналітичних лабораторіях при аналізі багатокомпонентних мультивіамінних препаратів, що містять мікроелементи.

***Бібліографічний список***

1.Левашова О.Л. Спосіб кількісного визначення заліза (ІІ) у фармацевтичній композиції. Пат. № 66532. МПК G01N 33/15, G01N 33/20, G01N 21/31, G01N31/12, A61K 33/26, A61P 7/06 / Левашова О.Л., Коваленко С.М.// Бюл. ПВ – 2012. – № 1.

2.Державна Фармакопея України / Державне підприєм­ство «Науково-експертний фармакопейний центр». –1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

3.Державна Фармакопея України / Державне підприєм­ство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Доп. 1. - Харків: РІРЕ, 2004. – 520 с

4.European Pharmacopoeia.– 5th ed. – Electronic version. - 2779 p.

5.Guidance for industry: Manufacturing and Controls Documentation. Draft guidance. - U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drag Evaluation and Research, Center for Biologies Evaluation and Research, 2000.

6.Руководство ICH "Валидация аналитических методик. Содержание и методология" Q2(R1): Междунар. конф. по гармонизации технических требований к регистрации медицинских лекарственных средств. Гармонизированное трехстороннее руководство ICH //ФАРМАЦИЯ. – 2008. – № 4. – C. 3–10.

7.Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Багиров В.Л., Гризодуб А.И., Чибиляев Т.Х. и др. – М., 2007. – 48 с.

8. **Гризодуб А.И**. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика /А.И. Гризодуб, О.Л. Левашова, Г.И. Борщевский //Фармаком. – 2011.– № 4.

.