СТАТЬЯ

УДК 615.074

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ФАРМАЦИИ

Трубицына И.М., Василенко И.А.

Институт фармации и биотехнологии РУДН, Москва, e-mail: irina.cymbal@mail.ru

Жирные кислоты и их производные находят широкое применение в фармации как вещества, обладающие собственной фармакологической активностью, и вспомогательные вещества в фармацевтической технологии. Ввиду постоянного совершенствования современных средств измерений и программного обеспечения, а также появления новых требований к достоверности результатов испытаний, на данный момент актуальным становится проведение валидации методик определения состава жирных кислот на современном оборудовании. В ходе данной работы проведена валидация методики определения состава жирных кислот в таком вспомогательном веществе фармацевтической технологии, как стеарат магния. Валидация проведена с использованием газового хроматографа Shimadzu GC-2010 в комплекте с пламенно-ионизационным детектором, программного обеспечения LabSolutions, а также фармакопейных стандартных образцов пальмитиновой и стеариновой кислот. В качестве испытуемого образца выступал произведенный в Нидерландах стеарат магния. Перед хроматографическим разделением проводилась дериватизация с использованием метанольного раствора трифторида бора. В ходе валидации подтверждена линейность, правильность, специфичность, внутрилабораторная прецизионность, повторяемость и робастность методики. Установлены предел обнаружения, предел количественного определения и аналитическая область методики. Доказано, что данная методика пригодна для получения достоверных сведений об испытуемом образце с высокой точностью.

Ключевые слова: валидация, газовая хроматография, состав жирных кислот, дериватизация

VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINING THE COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN PHARMACY

Trubitsyna I.M., Vasilenko I.A.

Institute of Pharmacy and Biotechnology RUDN, Moscow, e-mail: irina.cymbal@mail.ru

Fatty acids and their derivatives are widely used in pharmacy as substances with their own pharmacological activity and as auxiliary substances in pharmaceutical technology. Due to the constant improvement of modern measuring instruments and software, as well as the emergence of new requirements for the reliability of test results, validation of methods for determining the composition of fatty acids on modern equipment is currently becoming relevant. The validation of the method for determining the composition of fatty acids in such an auxiliary substance of pharmaceutical technology as magnesium stearate was carried out in the course of this work. Validation was carried out using a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph complete with a flame ionization detector, LabSolutions software, and pharmacopoeial standard samples of palmitic and stearic acids. The test sample was magnesium stearate produced in the Netherlands. Derivatization was performed using a methanol solution of boron trifluoride prior to chromatographic separation. The linearity, accuracy, specificity, intra-laboratory precision, repeatability and robustness of the method were confirmed during validation. The detection limit, the limit of quantification and the analytical range of the method were established. It has been proven that this method is suitable for obtaining reliable information about the test sample with high accuracy.

Keywords: validation, gas chromatography, fatty acid composition, derivatization

Введение

Жирные кислоты и их производные находят широкое применение в фармации. Некоторые из них обладают своей собственной фармакологической активностью [1-3]. Например, полиненасыщенные жирные кислоты и некоторые виды растительных масел. Среди вспомогательных веществ в фармацевтической технологии имеется внушительное количество жирных кислот и их производных, которые обладают эмульгирующими, скользящими, противоприлипающими и пластифицирующими свойствами.

Для подтверждения подлинности и количественного определения примесей при исследовании подобного рода веществ применяется метод газовой хроматографии [4; 5]. Согласно рекомендациям XV издания Государственной фармакопеи (ГФ) и международных стандартов, любую аналитическую методику необходимо подвергать валидации, что выражается в экспериментальном подтверждении пригодности таковой к практическому использованию в лаборатории в плане обеспечения получения достоверной информации об объекте исследования [6; 7].

Но методики исследования состава жирных кислот методом газовой хроматографии используются в практике лабораторий с середины прошлого века. С тех пор происходило постоянное усовершенствование газовых хроматографов и программного обеспечения, а также появление новых подходов к обработке хроматограмм и современных требований к достоверности результатов испытаний. А потому проведение валидации методики определения состава жирных кислот с использованием современного оборудования и программного обеспечения представляется актуальной задачей.

Целью исследования является обоснование выбора метода дериватизации стеарата магния для дальнейшего исследования методом газовой хроматографии и оптимизация условий хроматографического разделения. Посредством исследования намечено доказать повторяемость, внутрилабораторную прецизионность, робастность и правильность. Задачей ставится оценка предела обнаружения, предела количественного определения и аналитической области методики.

Материалы и методы исследования

Валидация методики проводится с использованием газового хроматографа Shimadzu 2010 в комплекте с пламенно-ионизационным детектором. Образцы европейской фармакопеи пальмитиновой и стеариновой кислот выступают в качестве стандартных. Испытуемым образцом является произведенный в Нидерландах стеарат магния. А для хроматографического разделения используется капиллярная колонка DB-WAX, Agilent, которая изготовлена из плавленого диоксида кремния, имеет длину 30 м и диаметр 0,32 мм, а также нанесенную фазу макрогол 20000 Р с толщиной пленки в 0,5 мкм.

Результаты исследований и их обсуждение

Дериватизация используется в анализе состава жирных кислот с целью получения более летучих дериватов. Жирные кислоты за счет высокой молекулярной массы и наличия гидроксильных полярных групп, склонных к образованию водородных связей, обладают низкой летучестью. Алкилирование, по результатам которого получают метиловые, этиловые и пропиловые эфиры карбоновых кислот, чаще всего применяют для исследования жирных кислот и их производных методом газовой хроматографии.

Сложные эфиры из свободных жирных кислот получают этерификацией, а в случае с триацилглицеридами и прочими производными жирными кислотами используется переэтерификация [8; 9]. Однако в щелочных условиях свободные жирные кислоты не этерифицируются, поэтому переэтерификация не подходит для триацилглицеридов с их содержанием. А переэтерификация и этерификация в последовательных щелочных и кислотных условиях пригодна для всех триглицеридов, которые не содержат лауриновые жирные кислоты [10]. Для проб с жирными кислотами целесообразно применять метод этерификации в кислотных условиях. Метанольный раствор трифторида бора этерифицирует свободные жирные кислоты и переэтерифицирует сложные эфиры жирных кислот [11]. И поэтому для получения метиловых эфиров из стеарата магния и используемых в качестве стандартных образцов пальмитиновой и стеариновой кислот выбран трифторид бора в метаноле (14%-ный раствор).

Объектом валидации выступает методика определения состава жирных кислот во вспомогательном веществе «магния стеарат» в соответствии с монографией 01/2022-0229 из 11 издания Европейской фармакопеи [12]. По итогам работы внесены некоторые уточнения в методику. Так, установлено, что деление потока газа-носителя 1 к 20 способствует отсутствию перегрузки капиллярной колонки и соблюдению требований к пригодности хроматографической системы. Перед валидацией важно проводить проверку пригодности хроматографической системы на соответствие требованиям методики, результаты которой представлены в таблице 1. Высокое значение разрешения между пиками метилпальмитата и метилстеарата указывает на то, что методика специфична.

Примеры хроматограмм представлены на рисунках 1 и 2.

В процессе валидации доказана линейность методики в широком диапазоне концентраций растворов стандартных образцов по 10 точкам от предела обнаружения методики до 120% от максимальной концентрации жирной кислоты в пробе. Рассчитанные коэффициенты корреляций составляют 0,9991 для пальмитиновой кислоты и 0,9993 для стеариновой кислоты, что выше требований ГФ РФ XV к коэффициенту 0,99. Построенные графики линейных зависимостей представлены на рисунках 3 и 4. Свободные члены линейных зависимостей ничтожно малы. Ниже допустимого уровня шума прибора 100 мкВ.

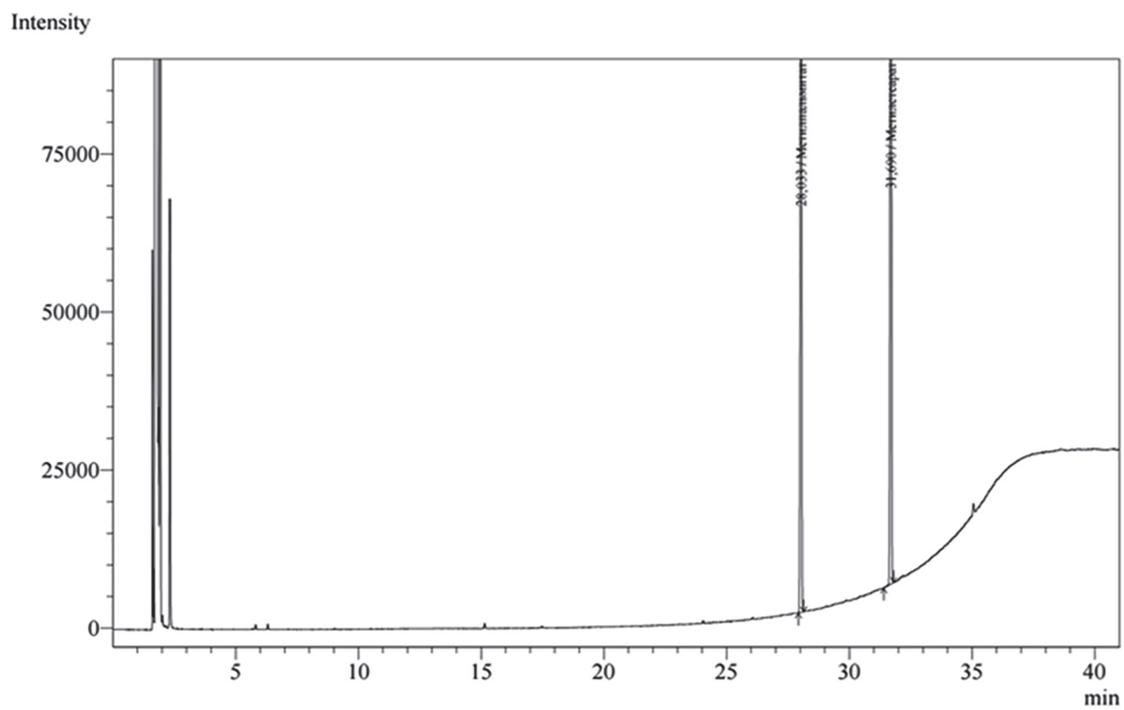
В процессе валидации удалось установить внутрилабораторную прецизионность методики посредством оценки значимости различий дисперсий двух выборок, полученных двумя разными операторами после проверок данных выборок на однородность [13-15]. Каждая выборка состояла из 10 повторностей. Расчетный критерий Фишера в данном случае ниже табличного значения. Также оценена робастность методики при замене газа-носителя с гелия на азот. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 1

Проверка пригодности хроматографической системы

Критерии приемлемости	Требования	Результат
Время удерживания пика метилпальмитата относительно пика метилстеарата	около 0,9	0,8846
Разрешение между пиком метилпальмитата и пиком метилстеарата на хроматограмме стандартного раствора	не менее 5,0	43,0
Относительное стандартное отклонение для площадей пиков метилпальмитата по результатам 6 повторных инжекций стандартного раствора	не более 3,0%	1,8%
Относительное стандартное отклонение для площадей пиков метилстеарата по результатам 6 повторных инжекций стандартного раствора	не более 3,0%	1,4%
Относительное стандартное отклонение для отношения площадей пиков метилпальмитата и метилстеарата по результатам 6 повторных инжекций стандартного раствора	не более 1,0%	0,4%

Источник: составлено авторами по результатам данного исследования.



Peak Table

FID1

Peak#	Ret.Time	Name	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Theoretical Plates
1	28,033	Метилпальмитат	724581,13	221540	0,889	0,000	1731017,122
2	31,690	Метилстеарат	716813,39	207083	0,911	41,585	1934166,249
Total			1441394,52	428623			

Рис. 1. Единичная хроматограмма стандартного раствора
Источник: составлено авторами по результатам данного исследования

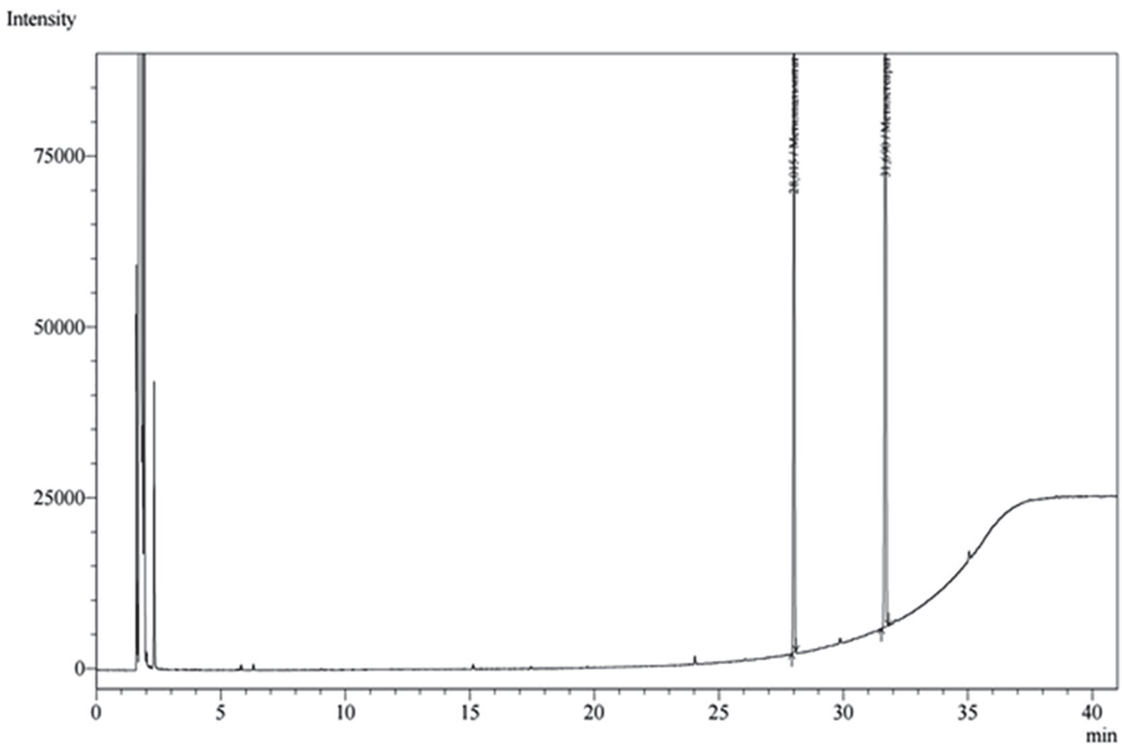
Выявленные в ходе валидации характеристики методики приведены в таблице 3. Для определения предела обнаружения и предела количественного определения использовался метод инструментальной оценки. В процессе валидации установлена концентрация раствора стандартных образцов, которая образует пик на хроматограмме с отношением уровня сигнала к шуму, равным 3. Данная концентрация (0,0125% от суммы жирных кислот) является пределом обнаружения. Концентрация раствора стандартных образцов, которая образует пик на хроматограмме с отношением сигнала к шуму, равным 10, является пределом количественного определения (0,04% от суммы жирных кислот).

Таблица 2

Оценка значимости различий дисперсий двух выборок при оценке показателей «внутрилабораторная прецизионность», «робастность»

Наименование показателя	Внутрилабораторная прецизионность		Робастность	
	Метилпальмитат	Метилстеарат	Метилпальмитат	Метилстеарат
Критерий Фишера табличный, F (0,05;9;9)	3,18			
Критерий Фишера расчетный	1,69	1,69	2,86	2,86

Источник: составлено авторами по результатам данного исследования.



Peak Table

FID1

Peak#	Ret.Time	Name	Area	ber of Theoretical Plat	Resolution(JP)	Conc.%
1	28,015	Метилпальмитат	415407,46	1832098	--	31,34395
2	31,690	Метилстеарат	909912,10	2132049	43,448	68,65605
Total			1325319,56			

Рис. 2. Единичная хроматограмма испытуемого раствора
Источник: составлено авторами по результатам данного исследования

Таблица 3

Показатели, установленные в результате валидации методики

Показатель повторяемости	0,027%
Показатель внутрилабораторной прецизионности	0,076%
Аналитическая область методики	От 0,0125% до 100% от суммы жирных кислот
Предел количественного определения	0,04% жирной кислоты от суммы жирных кислот
Предел обнаружения	0,0125% жирной кислоты от суммы жирных кислот
Неопределенность результатов исследования	0,06%

Источник: составлено авторами по результатам данного исследования.

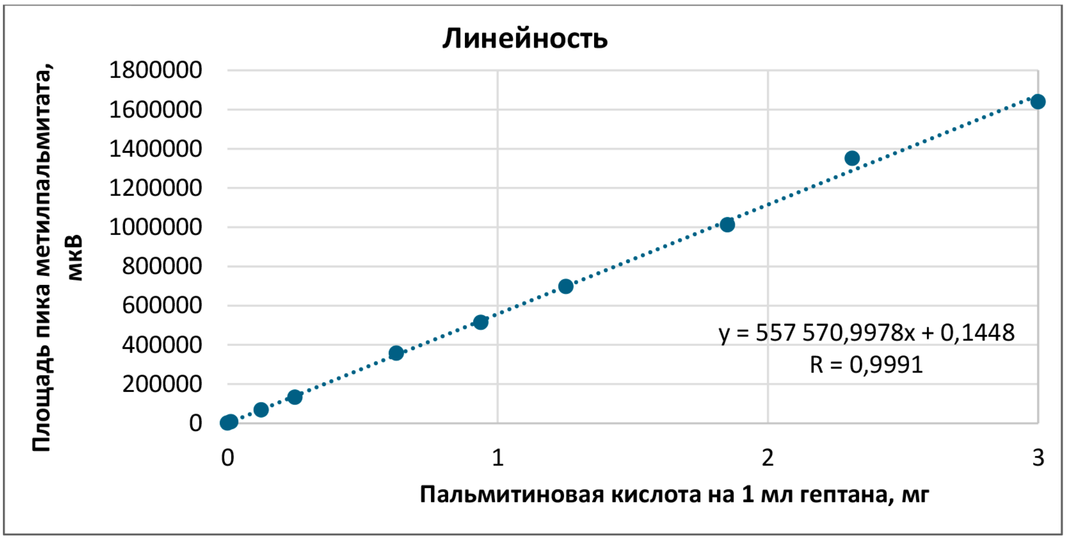


Рис. 3. График зависимости площадей пиков метилпальмитата от массы навески пальмитиновой кислоты
Источник: составлено авторами по результатам данного исследования

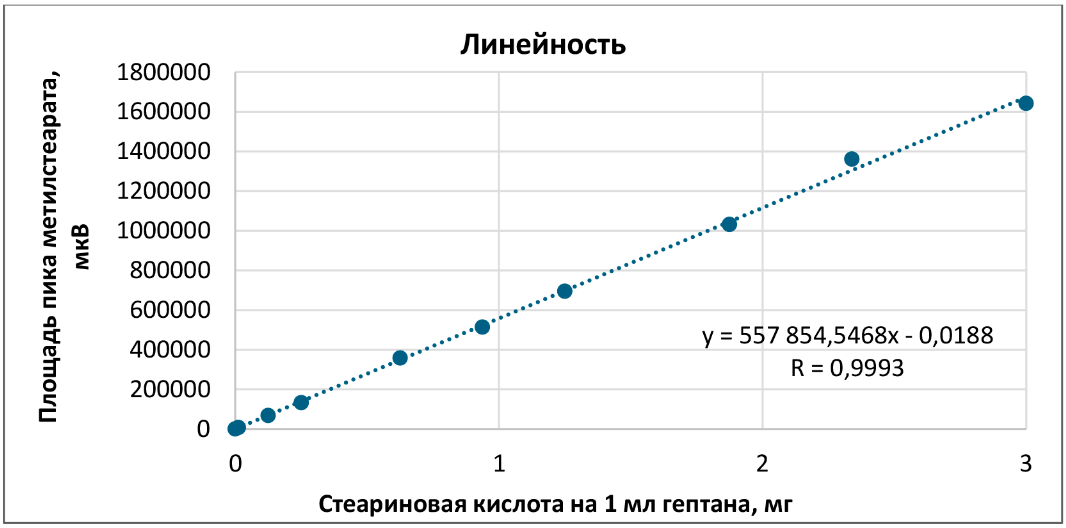


Рис. 4. График зависимости площадей пиков метилстеарата от массы навески стеариновой кислоты
Источник: составлено авторами по результатам данного исследования

Заключение

В процессе исследования теоретически обосновано использование 14% раствора трифторида бора в метаноле для дериватизации стеарата магния, подобраны условия проведения хроматографического разделения и установлено значение деления потока газа-носителя 1:20. Проведена валидация методики исследования состава жирных кислот с использованием современных поверенных средств измерения. По итогам валидации определено, что методика характеризуется соблюдением линейности в широком диапазоне от 0,0125% до 120% и специфична, доказана ее правильность. Полученные результаты оценки повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и робастности методики удовлетворяют критериям приемлемости.

Валидация методики исследования состава жирных кислот подтверждает собственную пригодность для получения достоверных сведений об испытуемом образце с высокой точностью. Установленный предел обнаружения 0,0125% от суммы жирных кислот оказался лучше значения в 1%, которое присуще для более ранних сведений о характеристиках подобных методик. Предел количественного определения составил 0,04%, что соответствует указаниям современных методик исследования состава жирных кислот, согласно которым не учитываются пики менее 0,05% от суммарного содержания жирных кислот.

Список литературы

1. Плавинский С.Л., Баринова А.Н. Использование препарата высококонцентрированных полиненасыщенных жирных кислот в профилактике осложнений после перенесенного инфаркта миокарда. Анализ стоимость-полезность // Медицина. 2017. Т. 5. № 4. (20). С. 8-20. URL: https://fsmj.ru/file/15/000/000310.pdf (дата обращения: 22.05.2025). DOI: 10.29234/2308-9113-2017-5-4-8-20. EDN: YPSZMN.

2. Синькова М.Н., Исаков Л.К., Тарасов Н.И., Тепляков А.Т. Отдаленные эффекты влияния омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на течение ишемической болезни сердца у больных, перенесших инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST на фоне многососудистого стенозирующего атеросклероза коронарных артерий // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2014. Т. 13. № 6. С. 32–37. URL: https://cardiovascular.elpub.ru/jour/article/download/79/83 (дата обращения: 22.05.2025). DOI: 10.15829/1728-8800-2014-6-32-37. EDN: TBSPAL.

3. Титов В.Н., Иванов Г.А., Антонов А.М. Лауриновая жирная кислота, среднецепочечные триглицериды, позитивное действие при синдроме резистентности к инсулину, дегенеративной патологии нейронов, атеросклерозе и атероматозе // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64. № 2. С. 68-77. URL: https://kld-journal.fedlab.ru/0869-2084/issue/download/9072/3961 (дата обращения: 22.05.2025). DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-2-68-77. EDN: PPVOIB.

4. Тринеева О.В. Особенности оценки качества и перспективы стандартизации жирных растительных масел и масляных экстрактов фармацевтического назначения (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2 (15). С. 114-134. URL: https://www.pharmjournal.ru/jour/article/download/93/92 (дата обращения: 22.05.2025). EDN: WYJZMH.

5. Тринеева О.В., Сливкин А.И. Изучение жирнокислотного состава растительных масел и масляных экстрактов фармацевтического назначения методами ГЖХ и ИКС // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 2. С. 212-219. URL: https://journals.vsu.ru/sorpchrom/article/download/1342/1401/ (дата обращения: 22.06.2025). EDN: VWHRPR.

6. ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Общая фармакопейная статья. 2023. 15 с. [Электронный ресурс]. URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/063/402/original/ОФС_Валидация_аналитических_методик.docx (дата обращения: 22.05.2025).

7. Киричевский М., Комарова С.С. Верификация методики измерений в химической лаборатории // Роль технического регулирования и стандартизации в эпоху цифровой экономики: сборник статей участников III Международной научно-практической конференции молодых ученых. Екатеринбург, 2021. С. 262-268. URL: https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/107525/3/978-5-91256-544-1_2021.pdf (дата обращения: 22.05.2025). EDN: HYPUDV.

8. ОФС.1.5.3.0017 Определение состава жирных кислот в маслах жирных растительных и жирах. Общая фармакопейная статья. 2023. 9 с. URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/063/532/original/ОФС_Определение_состава_жирных_кислот_в_маслах_жирных_растительных_и_жирах.docx (дата обращения: 22.05.2025).

9. ГОСТ 31665-2012. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. М.: Стандартинформ, 2013. 12 с. URL: https://protect.gost.ru/v.aspx?control=8&baseC=&RegNum=15&id=176472 (дата обращения: 22.05.2025).

10. 2.4.22. Composition of fatty acids by gas chromatography. Methods of analysis. European pharmacopoeia 11.0. 2023. P. 157-159. ISBN 978-92-871-9105-2.

11. ISO 12966-2 Жиры и масла животные и растительные. Газовая хроматография метиловых эфиров жирных кислот. 2011. 11 с.

12. Magnesium stearate. 01/2022:0229. Monographs. European pharmacopoeia 11.0 2023. P. 3535-3538. ISBN 978-92-871-9105-2.

13. ОФС.1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Общая фармакопейная статья. 2023. 51 с. URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/063/628/original/ОФС_Статистическая_обработка_результатов_физич__физико-химич_и_химич_испытаний.docx (дата обращения: 22.05.2025).

14. ГОСТ Р ИСО 21748-2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений. М.: ФГБУ «РСТ», 2021. 36 с.

15. МИ 2336-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. 58 с.