

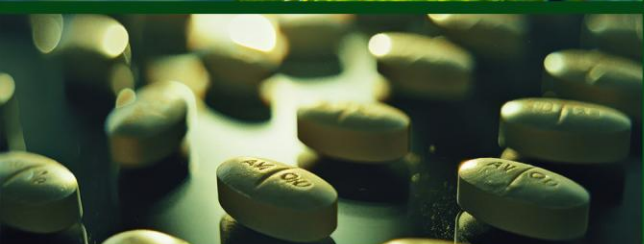


Ивана Митревска



АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 1

СКРИПТА



Штип, 2026 година

Ивана Митревска
АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 1
СКРИПТА

Автор:

Доц. д-р Ивана Митревска

Наслов на публикацијата:

АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 1, СКРИПТА

Рецензенти:

Проф. д-р Марија Дарковска Серафимовска

Проф. д-р Анета Димитровска

Лектор:

Далида Цветанова

Техничко уредување:

Ас. м-р Дино Карпичаров

Издавач:

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Уредник:

Проф. д-р Лилјана Колева Гудева

Објавено во е-библиотека:

<http://e-lib.ugd.edu.mk/1259>

DOI:

<https://www.doi.org/10.46763/m6082771427m>

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека “Св. Климент Охридски”, Скопје

615.07(076)

МИТРЕВСКА, Ивана

Аналитика на лекови 1 [Електронски извор] : скрипта / Ивана Митревска. - Штип: Универзитет “Гоце Делчев” - Штип, Факултет за медицински науки, 2026

Начин на пристапување (URL): <http://e-lib.ugd.edu.mk/1259>. - Текст во PDF формат, содржи XII, 157 стр., илустр. - Наслов преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 06.03.2026. - Фусноти кон текстот. - Биографски податоци: стр. 157. - Библиографија: стр. 153-156

ISBN 978-608-277-142-7

а) Лекови -- Аналитички испитувања -- Практикуми

COBISS.MK-ID 68346629

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



Автор:
Доц. д-р Ивана Митревска

АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ 1

Штип, 2026

ПРЕДГОВОР

Во светот на современата фармацевтска наука и индустрија обезбедувањето квалитетни, безбедни и ефикасни лекови претставува суштинска обврска и одговорност. Развојот и контролата на фармацевтските производи денес се одвиваат во строго регулирани рамки, со јасно дефинирани научни и регулаторни барања. Аналитичките испитувања се столб на овие процеси – тие обезбедуваат податоци што ја потврдуваат конзистентноста на квалитетот и усогласеноста со меѓународно прифатени стандарди и фармакопеи.

Ова учебно помагало претставува целосен и интегриран водич низ основните и напредните концепти во областа на фармацевтските анализи. Тоа е структурирано во девет тематски целини, секоја посветена на клучен сегмент од процесот на контролата на квалитетот и развојот на лековите:

- Првото поглавје ги обработува компендијалните (фармакопејски) тестови, кои претставуваат основа за стандардизација на аналитичките методи што се применуваат во производството и контролата на фармацевтските производи;
- Во второто и третото поглавје се опишуваат принципите за евалуација на аналитички резултати и проценка на мерната неопределеност, како критични аспекти за научно толкување и потврда на валидноста на резултатите;
- Следните две поглавја (четвртото и петтото) се посветени на поставувањето спецификации во различни фази од развојот на лекови и на документирањето на аналитичките активности во согласност со регулаторните барања, што е од клучно значење за транспарентност, следливост и усогласеност;
- Шестото и седмото поглавје ја обработуваат анализата на цврсти и парентерални дозирани форми – два фундаментално различни, но подеднакво критична типа фармацевтски производи. Во овие поглавја се опфатени физичко-хемииски тестови, спектроскопски техники, микроскопија и современи методи за карактеризација на активните и помошните супстанции;
- Осмото поглавје се фокусира на новите системи за испорака на лекови – наночестици, биорасположливост, целна испорака и иновативни уреди, кои се резултат на напредокот на фармацевтската технологија и барањата за персонализирана терапија;
- Завршното, деветто поглавје, се однесува на културата на квалитет и добрите производствени практики (GMP), како темелни принципи во фармацевтската индустрија, кои го гарантираат континуитетот на висок квалитет и регулаторна усогласеност во секој чекор од животниот циклус на лекот.

Ова учебно помагало е наменето за студенти на фармација и хемија, како и за млади аналитичари, контролори на квалитет, регулаторни лица и други професионалци вклучени во развојот, тестирањето и производството на фармацевтски производи. Тоа не само што претставува практичен прирачник туку и промовира критичко размислување, интердисциплинарен пристап и разбирање на целокупниот систем за осигурување на квалитетот во фармацевтската практика.

Со својот структуриран пристап, јасен јазик и научно заснована содржина, ова издание има за цел да ги поддржи образовните и професионалните напори за градење силни аналитички и регулаторни капацитети – во служба на здравјето и благосостојбата на пациентите.

Авторот

СОДРЖИНА

1. КОМПЕНДИЈАЛНИ (ФАРМАКОПЕЈСКИ) ТЕСТОВИ	1
1.1. Описи на активни супстанции и цврсти орални дозирани форми	1
1.2. Идентификација на активни фармацевтски супстанции	2
1.2.1. Активни состојки и цврсти орални дозирани форми	2
1.2.2. Специфични тестови за идентификација на активните супстанции	4
1.3. Содржина.....	6
1.4. Онечистувања	8
1.4.1. Органски онечистувања.....	8
1.4.2. Неоргански онечистувања.....	9
1.4.3. Резидуални растворувачи	9
1.5. Дополнителни тестови.....	10
1.6. Избор на соодветен компендиум	11
1.7. Валидација	11
1.8. Хармонизација на методите за испитување при поднесување на досие за регистрација во повеќе земји истовремено.....	12
2. ЕВАЛУАЦИЈА НА АНАЛИТИЧКИ РЕЗУЛТАТИ ВО СОГЛАСНОСТ СО БАРАЊАТА НА СИСТЕМОТ ЗА УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТ	13
2.1. Евалуација на резултати	13
2.1.1. Фаза на предтестирање.....	14
2.1.2. Фаза на тестирање.....	14
2.1.2.1. Верификација на методот	14
2.1.2.2. Генерирање необработени податоци од анализа на примерок	15
2.1.2.3. Преглед на необработените податоци	16
2.1.2.4. Пресметка на резултатите.....	16
2.1.2.5. Пресметување на просекот и заокружување на резултатите.....	16
2.1.2.6. Проверка на валидноста на резултатите.....	16
2.2. Препораки од ОМСЛ водичот за начин на евалуација на резултати	17
2.2.1. Евалуација на резултати при определување на содржина	18
2.2.2. Евалуација на резултати при определување на параметарот воедначеност на дозирани единици	20
2.2.3. Евалуација на резултати при определување на параметарот растворливост	20
2.2.4. Евалуација на резултати при определување на параметарот сродни и деградациски производи.....	20
2.3. Постапки при добивање резултати што се надвор од спецификација (OOS), неочекувани, атипични (OOE) резултати и резултати надвор од тренд (OOT).....	21
2.3.1. Резултати надвор од спецификацијата (OOS)	21
2.3.1.1. Фаза 1А: Почетна проверка.....	22
2.3.1.2. Фаза 1Б: Продолжена истрага.....	22
2.3.1.3. Фаза 2: Целосна лабораториска истрага.....	23
2.3.2. Неочекувани, атипични резултати (OOE)	23
2.3.3. Статистички <i>outlier</i> резултати.....	24
2.3.3.1. Grubbs тест (Extreme Studentized Deviate Test 'ESD Test')	25
2.3.3.2. Dixon тест (Q-Test)	26
2.3.3.3. Постапка при добивање на <i>outlier</i> резултати.....	27
2.4. Известување (прикажување) на аналитички резултати.....	27
3. ЕВАЛУАЦИЈА НА МЕРНА НЕОДРЕДЕНОСТ КАЈ АНАЛИТИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА	30
3.1. Основи за мерната неодреденост.....	30

3.2.	Аналитичко мерење и неодреденост	30
3.3.	Општ пристап за евалуација на мерната неодреденост	32
3.4.	Одлука за усогласеност на резултатот од тестот, земајќи ја предвид мерната неодреденост.....	33
3.5.	Известување на резултат со мерна неодреденост	33
3.6.	Проценка на мерната неодреденост со примена на пристапот од долу нагоре (Bottom-up approach).....	33
3.6.1.	Процена на мерната неодреденост со пристапот од долу нагоре (Bottom-up) при одредување на концентрацијата на тироидниот ослободувачки хормон (TRH) во раствор.....	34
3.7.	Проценка на мерната неодреденост со примена на пристапот од горе надолу (Top-down approach).....	42
3.7.1.	Проценка на мерната неодреденост со пристапот од горе надолу (Top-down) преку определување на параметарот точност при валидација на аналитички метод за определување на карпрофен.....	43
4.	ВОСПОСТАВУВАЊЕ СПЕЦИФИКАЦИИ	50
4.1.	Воспоставување спецификации во различни фази од развојот на лековите..	51
4.1.1.	Претклинички студии	51
4.1.1.1.	Претклинички студии: активна супстанција	51
4.1.1.2.	Претклинички студии: претклинички дозирани форми	52
4.1.1.3.	Претклинички студии: онечистувања.....	52
4.1.1.4.	Претклинички студии: метаболити.....	52
4.1.2.	Клиничко испитување	52
4.1.2.1.	Клиничко испитување: активна супстанција	52
4.1.2.2.	Клиничко испитување: клинички формулации.....	53
4.1.3.	Клинички испитувања од фаза II и фаза III.....	53
4.1.4.	Подготовка и поднесување апликација за нов лек (барање на одобрение за ставање на лек во промет)	54
4.2.	Меѓународна конференција за хармонизација (ICH)	54
4.2.1.	Q6A водич, Спецификации: Постапки за тестирање и критериуми за прифатливост за нови активни супстанции и нови готови производи (хемиски супстанции).....	56
4.2.1.1.	Цели на Q6A водичот	57
4.2.1.2.	Опсег на Q6A водичот	57
4.2.1.3.	Општи концепти на Q6A водичот	57
4.2.1.4.	Оправдување на спецификациите	59
4.2.1.5.	Универзални тестови и критериуми за прифатливост	59
4.2.1.6.	Специфични тестови и критериуми за прифатливост	59
4.2.1.6.1.	Специфични тестови и критериуми за прифатливост за нови активни супстанции.....	60
4.2.1.6.2.	Специфични тестови и критериуми за прифатливост за нови готови производи.....	61
4.3.	Фармакопеи и спецификации	64
4.4.	Статистички разгледувања во воспоставувањето на спецификациите.....	65
5.	ДОКУМЕНТАЦИЈА ВО ФАРМАЦЕВТСКИТЕ АНАЛИЗИ.....	66
5.1.	Фармацевтска анализа во текот на животниот циклус на производот.....	66
5.1.1.	Откривање: Скрининг на кандидат-молекули.....	67
5.1.2.	Селекција на кандидат-молекула во клиничка фаза.....	68
5.1.3.	Фаза 0: Претклинички развој на кандидат-молекулата.....	69
5.1.4.	Фаза 1: Аплицирање на избраната клиничка формулација кај луѓе	70
5.1.5.	Фаза 2: Студии за докажување на безбедноста и ефикасноста на лекот	70

5.1.6.	Фаза 3: Клучни испитувања за ефикасност и подготовка за регистрација	71
5.1.7.	Фаза 4: Период по одобрување и маркетинг на новиот фармацевтски производ	73
5.2.	Потребна документација за досие за регистрација	73
5.3.	Потребна документација за усогласеност	76
5.4.	Истражувачки документи во фармацевтскиот развој	80
6.	ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ НА ЦВРСТИ ДОЗИРАНИ ФОРМИ	82
6.1.	Влијание на регулативата и улогата на ICH	84
6.2.	Улогата на аналитичките научници во развојот на нови лекови	85
6.3.	Тестови и спецификации	85
6.4.	Техники за физичко-хемишка карактеризација	89
6.4.1.	Микроскопија	89
6.4.2.	Рендгенска дифракција на прашок (XRPD)	90
6.4.3.	Термални анализи	91
6.4.4.	FTIR микроспектроскопија	92
6.4.5.	Нуклеарно-магнетна резонантна (NMR) спектроскопија	93
6.4.6.	Раманова спектроскопија	94
6.4.6.1.	Споредба на раманова и NMR спектроскопија во карактеризација на фармацевтски супстанции	95
6.5.	High-throughput техники во фармацевтските анализи на цврсти дозирани форми	96
6.5.1.	Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија	96
6.5.1.2.	Примена на NIR спектроскопијата во фармацевтската практика	97
6.5.1.2.1.	Примена на NIR спектроскопијата за идентификација на пакувани клинички дозирани форми	98
6.5.1.2.2.	Примена на NIR спектроскопијата за идентификација на суровини	99
6.5.1.2.3.	Примена на NIR спектроскопијата за оценување на хомогеност на смеса	100
6.5.1.2.4.	Примена на NIR спектроскопијата во квантитативна анализа	101
6.5.2.	Фибер-оптичко следење на растворливост	101
6.5.3.	Проточна инјекциска анализа (FIA)	103
6.5.4.	Роботика и лабораториска автоматизација	104
6.6.	Идни насоки во фармацевтските анализи на цврсти дозирани форми	106
7.	ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ НА ПАРЕНТЕРАЛНИ ДОЗИРАНИ ФОРМИ	107
7.1.	Фармацевтски анализи во текот на преформулација и формулација на парентерални дозирани форми	108
7.2.	Аналитичко тестирање на готови парентерални дозирани форми	110
7.2.1.	Хемиско тестирање на готови парентерални дозирани форми	110
7.2.2.	Микробиолошко тестирање на готови парентерални дозирани форми	110
7.3.	Тестирање на материјалот за пакување на парентералните дозирани форми	111
7.3.1.	Стаклени садови	111
7.3.2.	Пластични садови	111
7.3.3.	Еластомерни затворачи	112
7.4.	Поддршка за развој на парентерални дозирани форми	112
7.5.	Тестирање во текот на производниот процес на парентералните дозирани форми	113
7.6.	Тестирање при пуштање на парентералните дозирани форми во промет	114
7.7.	Тестирање на суровините што влегуваат во состав на парентералните дозирани форми	115

7.8.	Микробиолошко тестирање на парентералните дозирани форми.....	117
7.9.	Тест за стерилност на парентералните дозирани форми	117
7.9.1.	Природа и ограничувања на тестот за стерилност	118
7.9.2.	Методи за изведба на тестот за стерилност	118
7.9.3.	Хранителни подлоги за изведба на тестот за стерилност	119
7.9.4.	Број на примероци за изведба на тестот за стерилност.....	119
7.9.5.	Време и температура на инкубација за изведба на тестот за стерилност	120
7.9.6.	Интерпретација на резултатите од тестот за стерилност	120
7.10.	Проценка на биооптоварување кај парентерални дозирани форми	121
7.10.1.	Земање примероци за проценка на биооптоварување кај парентерални дозирани форми.....	121
7.10.2.	Тестови за микробно броење според USP.....	122
7.10.3.	Определување на ТАС и ТУМС со метод за броење плочи	122
7.10.4.	Воспоставување граници за биооптоварување	123
8.	ИНОВАТИВНИ СИСТЕМИ ЗА ИСПОРАКА НА ЛЕКОВИ	124
8.1.	Орална и гастроинтестинална испорака на лекови	124
8.1.1.	Испорака на лекови преку желудникот	125
8.1.2.	Испорака на лекови преку дебелото црево	126
8.2.	Директна испорака на лекови.....	127
8.2.1.	Испорака на лекови преку назалната празнина (назалната слузница)...	127
8.2.2.	Испорака на лекови преку ректумот.....	128
8.3.	Дерматолошки системи за испорака на лекови	128
8.4.	Системи за испорака на лекови насочени кон канцер	129
8.5.	Биоразградливи системи за испорака на лекови	130
8.5.1.	Својства на наночестиците.....	131
8.5.2.	<i>In vivo</i> примена на биоразградливите системи за испорака на лекови...	132
8.6.	Системи за испорака на протеински лекови.....	133
8.6.1.	Орална патека за испорака на инсулин	133
8.6.2.	Белодробна (назална) патека за испорака на инсулин.....	135
8.6.3.	Ректална патека за испорака на инсулин	135
8.6.4.	Дермална патека за испорака на инсулин.....	136
8.6.5.	Очна патека за испорака на инсулин	136
8.7.	Уреди	136
8.7.1.	Инјектори без игла	136
8.7.2.	Импланти.....	138
8.7.3.	Инхалатори.....	139
9.	КУЛТУРА НА КВАЛИТЕТ И ДОБРИ ПРОИЗВОДСТВЕНИ ПРАКТИКИ ВО ФАРМАЦЕВТСКАТА ИНДУСТРИЈА	141
9.1.	Концепт на култура на квалитет	141
9.2.	Добри производствени практики	141
9.3.	Систем за управување со квалитет	143
9.3.1.	Дигитализација на системот за управување со квалитет (eQMS).....	144
9.3.2.	Видови системи за управување со квалитет	144
9.4.	Придобивки од културата на квалитет.....	145
9.5.	Национална регулатива: Улогата на МАЛМЕД во GMP и QMS.....	146
9.6.	Фармаковигиланца и управување со ризик во рамки на QMS.....	146
9.7.	Примери од инспекциски надзори и регулаторни предупредувања	147
9.8.	Предизвици за развивање култура на квалитет.....	148
9.9.	Сертификација од страна на квалификувано лице и пуштање на серија лек во промет	148

9.9.1.	Процес на сертификација на серија лек.....	150
9.9.2.	Справување со неочекувани отстапувања во процесот на сертификација	151
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....		153

1. КОМПЕНДИЈАЛНИ (ФАРМАКОПЕЈСКИ) ТЕСТОВИ

Компендијалните (фармакопејски) тестови ги опфаќаат сите аналитички тестови што се потребни да го докажат идентитетот, ефикасноста и безбедноста на готовите производи пред да се пакуваат или дистрибуираат на пазар. Притоа се користат различни аналитички техники, кои може да вклучуваат физичко тестирање, но и сложени хроматографски сепарации (Gilpin & Pachla, 1999). Степенот на тестирање што го бара производот зависи од карактеристиките на соединението, бројот на компонентите во производот и дозираната форма. Во денешно време, кога постои силна глобализација на бизнисот, повеќето фармацевтски компании ги дистрибуираат своите производи во повеќе од една земја. Кога се размислува да се пласира нов производ на пазарот, апликацијата за регистрација треба да биде доставена до регулаторните агенции на секоја од државите посебно каде производот треба да биде пласиран на пазарот. Соединетите Американски Држави, Јапонија, Велика Британија и Европската Унија имаат свои фармакопеи, методи на тестирање и спецификации. Кога се поднесува барање за регистрација на нови лекови, понекогаш, како што ќе видиме, регулаторната агенција може да побара и дополнително тестирање за производот пред тој да се дистрибуира на пазарот во таа земја. Последниве години имаше напор да се усогласат компендијалните барања и е постигнат значителен напредок во одредени области.

Лабораториите за контрола на квалитет (Quality Control Laboratories) претставуваат лаборатории кои тестираат сировини, активни супстанции и готови производи за кои се потребни различни видови тестирање. При тестирањето за повеќето сировини потребни се дополнителни методи, додека за тестирање готови производи не се потребни дополнителни испитувања. Откако ќе се добие одобрение за ставање на лекот во промет од страна на соодветната регулаторна агенција, методите на тестирање што се користат при развојот на производот ќе бидат вградени во USP/BP фармакопеите како официјални компендијални методи (USP, 1999; USP, 2000a). Постојат и други ситуации, како, на пример, кога нов производ содржи претходно одобрена активна супстанција за која можеби веќе постојат компендијални методи. Притоа постојните компендијални методи можеби нема да бидат соодветни за новиот производ, па сама по себе ќе се наметне потребата од развој на нови соодветни методи.

Постојат четири аналитички тестови кои генерално се сметаат за универзални од страна на регулаторните тела: опис, идентификација, определување на содржина и онечистувања. Спротивно на тоа, описите на активните супстанции и сировините само го опишуваат физичкиот изглед на супстанцијата. Овие тестови ги претставуваат минималните барања за тестирање на серија на готов производ што треба да се ослободи од лабораторијата за испитување и контрола на квалитетот. Може да бидат потребни дополнителни тестови во зависност од карактеристиките на конкретната супстанција и дозираната форма. За активни супстанции кои се продаваат во повеќе од една дозирана форма потребни се различни методи за секоја од нив или може да бидат потребни варијации на постоечките методи.

Во повеќето лаборатории за испитување и контрола на квалитет постојат внатрешни стандарди за квалитетот на секој производ, дозирана форма и јачина. Системот за квалитет ги содржи сите методи за тестирање и спецификациите потребни за ослободување на пазар на секоја серија од даден производ. Дополнително, системот за квалитет може да содржи и примероци од хроматограми од течна хроматографија со високи перформанси (HPLC), ултравиолетово-видливи (UV-Vis) и инфрацрвени (IR) спектри за да му помогнат на аналитичарот во извршувањето на секој тест. Почетната обука на аналитичарите кои се нови во лабораторијата за испитување и контрола на лекови, вообичаено, вклучува читање на Општите поглавја за тестови, како што се: тенкослојна хроматографија (TLC), губиток при сушење и тестирање на вода.

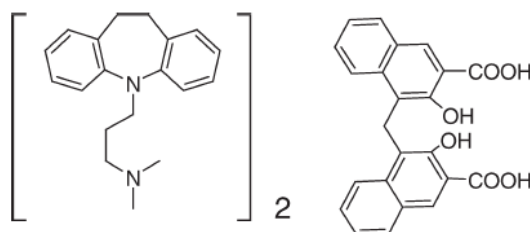
1.1. Описи на активни супстанции и цврсти орални дозирани форми

Тестот за опис е квалитативен физички опис на лекот, вклучувајќи ја дозираната форма и сите визуелни карактеристики, како, на пример, големина, форма, боја, но и сите други идентификациски ознаки. Тестот за опис е критичен и ако не е точен, серијата

на производот веднаш се смета за неисправна. Тестирањето на описот не е вклучено во USP/BP фармакопеите, бидејќи физичкиот опис на производот е единствен за производителот (USP, 1999; USP, 2000a). Генерички производи кои содржат иста активна супстанција имаат свои идентификациски ознаки кои се различни од ознаките на брендираниот производ.

1.2. Идентификација на активни фармацевтски супстанции

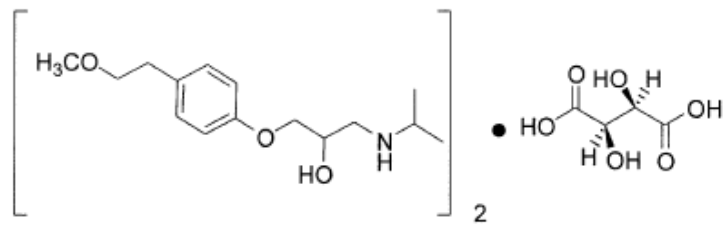
Тестирањето за идентификација е дизајнирано да го потврди идентитетот или присуството на активната супстанција со примена на различни аналитички техники и методи (Gilpin & Pachla, 1999). За формулации на лекови активната супстанција можеби ќе треба да се екстрахира од дозираната форма. Новите техники, како што е IR спектроскопијата, може да ја елиминираат потребата од изолирање на активната супстанција. Откако ќе се добие чистото соединение, се користи одредена спектроскопска техника, како, на пример, UV-Vis и IR спектроскопија, или, пак, точка на топење, по што се споредува идентитетот на примерокот со оној на стандардот, но притоа треба да се внимава примерокот и стандардот да бидат слично подготвени (Budavari, 1996). Карактеристиките на соединението ќе помогнат да се дефинира кој тип спектроскопија ќе биде најкорисна. Една од најважните цели на тестирањето за идентификација е тоа што методите мора да бидат доволно специфични за да се разликуваат соединенија со слична структура, вклучувајќи влезни суровини и деградациони производи. Во одредени случаи неспецифичните методи може да се користат заедно за да се добие позитивна лична карта. HPLC е најчесто користена аналитичка техника, при што времето на задржување на соединението е индикативно за неговиот идентитет. Сепак, времето на задржување, вообичаено, не се смета за специфичен параметар за идентификација, но може да се користи заедно со други тестови, како, на пример, TLC, IR и UV-Vis спектроскопија или, пак, физички тестови од типот на точка на топење. Кога се користи времето на задржување, стандардот и примерокот мора да се елуираат во слично време. Многу лекови се користат во форма на сол. Нивната идентификација може да вклучува тест за специфичниот контрајон што се користи. Заеднички контрајони што се користат во фармацевтските производи се: натриум, хлорид и памоат јоните, како што е прикажано на Слика 1.



Слика 1. Структура на имипримин памоат (Ahuja & Scypinski, 2001)

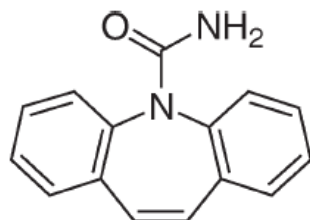
1.2.1. Активни состојки и цврсти орални дозирани форми

Метопролол тартарат е синтетичка активна супстанција која се користи за лекување на хипертензија (Слика 2.). Лековитата супстанција е сол (2:1) и содржи рацемска смеса од оптички изомери на метопролол и природно присутната декстрогира киселина. И активната супстанција и дозираната форма таблета имаат различни барања за тестирање (Luch, 1985). Тестирањето на таблетите со метопролол тартарат вклучува UV и IR спектроскопија метопролол ID, TLC за ID на тартарат јоните и HPLC времето на задржување за идентификација. Тестот со IR спектроскопија се изведува со растворање на околу 136 mg ситно спрашени таблети во 25 mL вода со 4 mL амониум хидроксид (1:3). По екстракција со хлороформ, органскиот слој се суши над безводен натриум сулфат, испарува и се става во замрзнувач за да се згуснат кристалите. Откако ќе се формираат, кристалите се тритуираат со калиум бромид и се користи во форма на дискови со цел добивање IR спектар, кој потоа се споредува со тој на слично подготвен стандард (Sievert & Drouen, 1993).



Слика 2. Структура на метопролол тартарат (Ahuja & Scypinski, 2001)

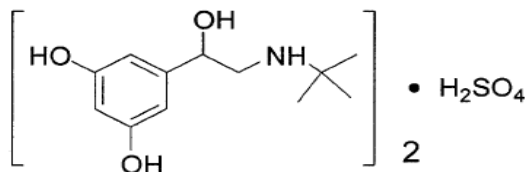
Тестот за тартаратни јони следи многу вообичаена процедура базирана на TLC. Примерокот и стандардните раствори со еднаква концентрација се аплицираат на плоча за хроматографија која содржи специфичен адсорбент. Одвојувањето на компонентите во примерокот за анализа се заснова на разликите во афинитетот за стационарниот TLC адсорбент наспроти смесата на мобилните растворувачи, т.е. мобилната фаза. Мобилната фаза се користи за развој на плочата, најчесто поместувајќи ги примероците на одредено растојание познат како Rf-вредност. Доколку супстанциите во примерокот и стандардниот раствор се исти, тие ќе имаат идентични Rf-вредности. Повеќето органски соединенија не се обоени и не флуоресцираат во опсегот на видливата светлина, т.е. не се видливи со голо око и бараат некаква форма на визуализација. Во повеќето случаи UV светлината му овозможува на аналитичарот да ги види дажките и, врз основа на тоа, да ги пресмета Rf-вредностите. Спротивно на тоа, метопролол тартарат во форма на инјекција бара само IR идентификација и процедурата е речиси идентична со онаа за идентификација на метопролол тартарат во форма на таблета. Единствената разлика е во тоа што кај инјекциите се користи специфичен волумен на инјекцијата, која веќе е растворена во вода. Ова е добар пример кога со мала измена во аналитичката постапка може да се постигне анализа на две многу различни фармацевтски дозирани форми. Карбамазепинот претставува аналгетик и антиконвулзив, кој се користи во форма на таблети, таблети за цвакање и орална суспензија (Слика 3.). Притоа, мора да се истакне дека за идентификација на активната супстанција во таблетите и оралната суспензија се користат изразито различни постапки.



Слика 3. Структура на карбамазепин (Ahuja & Scypinski, 2001)

Тестот за идентификација на активната супстанција карбамазепин вклучува примена на дифракција со X-зраци. Секоја кристална форма на ова соединение дава свој уникатен модел на дифракција на X-зраците, кој се смета за клучен за негова идентификација. Моделите на дифракција на X-зраци може да се добијат од еден кристал или од примерок од прав и потоа може да се користи за квантитативна и квалитативна анализа на супстанцијата. За идентификација на карбамазепин во дозираната форма таблети се добива IR спектар со постапка малку поинаква од онаа за метопролол. За да се спроведе тестот, 360 mg таблети во прав се варат во 15 mL ацетон, се филтрираат и испаруваат до околу 5 mL со помош на проток на азот. При постапката на ладењето во ледена бања се добиваат кристали, кои по филтрирање и сушење се користат во *Nujol mull*, за да се добие IR спектар. Овие постапки илустрираат како суровината и формулираниот производ имаат различни барања за идентификација. Формулираниот производ бара дополнителен чекор на екстракција и прочистување на примерокот, додека активната супстанција веќе се смета за чисто соединение.

Друг пример на активна супстанција со различни постапки за идентификација во дозирана форма е тербуталин сулфат, кој е синтетски β 2-адренорецептор и се користи како бронходилататор за третман на астма (Слика 4.).

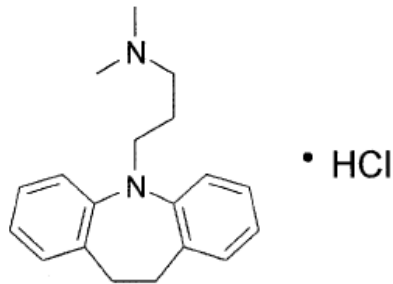


Слика 4. Структура на тербуталин сулфат (Ahuja & Scypinski, 2001)

Соединението е достапно во различни дозирани форми, односно во вид на аеросол за инхалација, инјекции и таблети. Аеросолот за инхалација е најуникатен од трите фармацевтски дозирани форми. Аеросолот се состои од суспензија на фини честици на тербуталин сулфат во затворен сад за аеросол под притисок, опремен со вентил за измерена доза и орален активатор за инхалација (Ganderton, 1999). За да се извлече примерокот од аеросолот, 10 наполнети контејнери се ладат на $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ во смеса од ацетон и сув мраз, во времетраење од 15 - 20 минути. Врвовите (капачињата) од затворениот сад се отстрануваат, а содржината се истура во чаша. Дел од оваа смеса се екстрахира со хлороформ и се филтрира преку стаклена инка со средна порозност. Откако остатокот ќе се измие со хлороформ и ќе се исуши на воздух, формираните кристали се користат за да се формираат дискови од КВг и да се добие IR спектар. Кај таблетите со тербуталин, за да се идентификува активната супстанција се користи TLC метод. Притоа таблетите се раствораат во разреден етанол и се центрифугираат. Нерастворените ексципиенси се таложат на дното, а растворот на етанол што ја содржи активната супстанција се аплицира на TLC плочата. Плочата се развива со помош на смеса од циклохексан, изопропил алкохол и мравја киселина како мобилна фаза, а потоа се сушат на воздух. За разлика од анализата на тартарат кај метопролол со примена на TLC, кога се користеше UV светлина за визуализација на дамките, кај анализата на тербуталин се користи специфичен реагенс што се прска врз плочата за да се овозможи визуализација на дамките. Откако плочата ќе се испрска со спреј-реагенсот, се појавуваат обоени дамки со промена на бојата, индикативна за класата на соединението и употребениот реагенс. Во случај на тербуталин, кој претставува дериват на фенол, се користи 4-аминоантипирин калиум ферицијанид. Се подготвуваат посебни раствори на 4-аминоантипирин и калиум ферицијанид и секој посебно се прска на плочата. Изложување на прсканата плоча со 25% амониум хидроксид резултира со појава на црвено-портокалови до розови дамки, кои укажуваат на присуство на феноли. Познати се бројни спреј-реагенси и истите се специфични за различни класи соединенија.

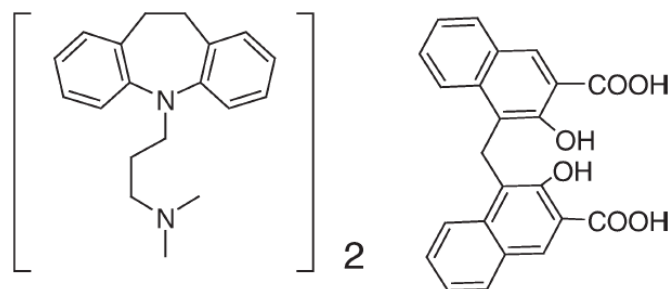
1.2.2. Специфични тестови за идентификација на активните супстанции

Тестовите за идентификација на чисти активни супстанции може да се разликуваат од оние за формулирани производи. Многупати специфичните тестови се наменети само за јонот на активната супстанција. Овие тестови се многу општи и честопати може да се проследени со официјалните (компендијални) методи. Импримин хидрохлорид е оригиналниот трицикличен антидепресив, кој е член на класата соединенија познати како дибензазепини (Слика 5.).



Слика 5. Структура на имипримин хидрохлорид (Ahuja & Scypinski, 2001)

Имипримин е хидрохлоридна сол достапна во форма на таблети и дози за инјектирање. Хлоридот како контрајон на имипримин хидрохлорид е идентификуван како дел од активната супстанција. За да се спроведе тестот, се раствора прашокот од мострата во алкохол и потоа се додава 2N азотна киселина, заедно со три капки тест раствор на сребро нитрат. Како резултат на тоа се формира бел талог на сребро хлорид, кој се раствора со додавање на амониум хидроксид, при што се потврдува присуството на хлоридниот јон. Идентификацијата на хлорид се користи за тестирање на активната супстанција, и истата не е потребна за готовиот производ. Имипримин, исто така, е достапен како памоатна сол (Слика 6.). Со цел да се идентификува јонот на памоат, се користи TLC метод. Се подготвува стандарден раствор на памоева киселина, со растворање во раствор на натриум хидроксид. Со растворање на прашокот од таблетата во натриум хидроксид се извлекува памоатниот јон од дозираната форма раствор и потоа, со хлороформ, се прави екстракција на активната супстанција. Во водениот слој останува јонот на памоат, а хлороформскиот слој се фрла. И примерокот и стандардниот раствор се забележуваат на TLC плочата, така што како мобилна фаза се користи смеса од оцетна киселина, етил ацетат, вода и хлороводородна киселина. Откако ќе се развијат петната, плочата се прска со спреј-реагенс калиум дихромат, со цел детекција и визуализација на дамките. Во овој случај примена на едноставна реакција на јонска измена, како, на пример, реакциите кои се користат за идентификација на контрајони (хлориди или сулфати), не може да се користи за памоат јонот.



Слика 6. Структура на имипримин памоат (Ahuja & Scypinski, 2001)

Тестот за идентификација на контрајонот поврзан со тербуталин сулфат е сличен при идентификација на имипримин хидрохлорид. Се подготвува воден раствор на тербуталин сулфат и потоа се закиселува со хлороводородна киселина. По додавање неколку капки раствор на бариум хлорид се формира бел талог кој потекнува од бариум сулфат.

Активната супстанција резерпин е оптички активна молекула која содржи шест асиметрични јаглороди. Едно од својствата уникатни за оптичките активни соединенија е нивната способност да ја ротираат рамнината на поларизираната светлина. Степенот на ротација зависи од концентрацијата на примерокот и должината на патеката на примерокот. Специфичната ротација, означена со $[\alpha]_D$, ги зема предвид овие параметри и претставува мерка за способноста на соединението да ја ротира рамнината на поларизираната светлина. Сите чисти оптички активни соединенија имаат своја

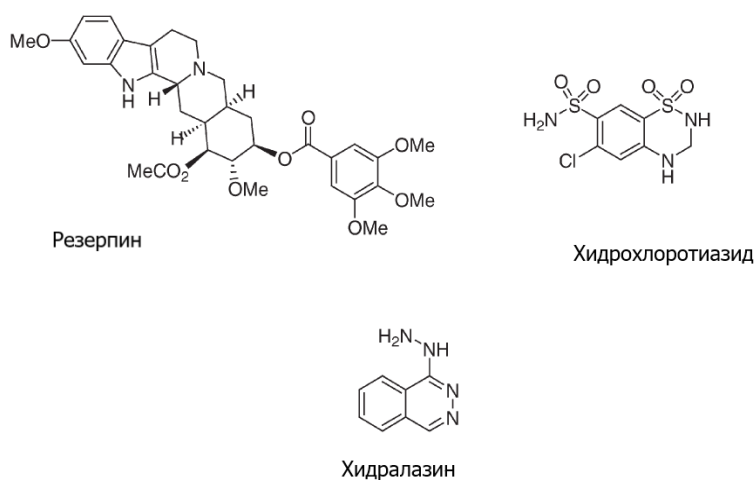
специфична ротација, која може да се користи за нивно идентификување. Така, аголот на ротација на резерпин се одредува со користење раствор со позната концентрација во хлороформ. За таа цел се користи посебен инструмент, означен како полариметар, а мерењето се врши на собна температура и со споредба со стандард.

Тестирањето за идентификација на фармацевтските соединенија е еден од повеќето тестови што се применуваат на готови производи во една лабораторија за испитување и контрола на квалитет. Физичките и хемиските својства на молекулата и дозираната форма претставуваат предизвик за аналитичарите и бараат експертиза во влажната и инструментална хемија, со цел правилна идентификација на примерокот што се проучува.

1.3. Содржина

Друг тест што вообичаено се изведува во една лабораторија за испитување и контрола на квалитет претставува тестот за параметрот содржина. Овој тест се користи за да се одреди чистотата и количината на активната супстанција присутна во дозираната форма. Информациите се користат за да се потврди тврдењето на производителот за декларираната содржина. Вообичаено, за тестирање на содржината се применуваат UV спектроскопски, волуметриски и HPLC методи. Постарите методи, генерално, вклучуваат автоматизирани UV системи. Меѓутоа, поновите методи за определување на содржина се темелат на HPLC, главно поради специфичноста на оваа техника.

Едни од поинтересните тестови за определување содржина претставуваат тестовите кои се применуваат на дозирани форми кои содржат повеќе од една активна супстанција. Слично како и тестовите за идентификација, во зависност од дозираната форма, може да бидат потребни различни процедури. Еден од најфасцинантните производи кој содржи повеќе активни компоненти во својот состав претставува комбинацијата на природниот производ резерпин, хидралазин хидрохлорид и хидрохлоротиазид. Овој лек е достапен во форма на таблети, кои содржат: 0,1 mg резерпин, 25 mg хидралазин хидрохлорид и 15 mg хидрохлоротиазид (Слика 7.).



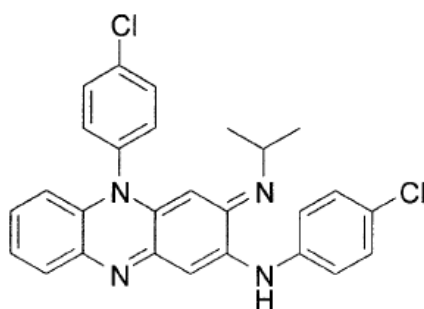
Слика 7. Структури на резерпин, хидралазин и хидрохлоротиазид (Ahuja & Scypinski, 2001)

Резерпинот е добиен од индол-алкалоид со потекло од исушениот корен на *Rauwolfia serpentina* и е добро познат по својата комплексна молекуларна архитектура, од аспект на предизвиците со кои се соочуваат аналитичарите во текот на неговата целосна синтеза, како и неговиот ефект врз централниот нервен систем како антихипертензив. Хидралазинот, исто така, претставува антихипертензив, а хидрохлоротиазидот поседува диуретски својства. Комбинацијата на овие три многу различни молекуларни структури внесува диверзитет во поглед на потребното аналитичко тестирање. Типична е процедурата за анализа која вклучува споредба со

надворешен стандарден раствор со позната концентрација и иста концентрација на примерокот, користејќи спектроскопска или волуметриска техника. Својствата на активните супстанции се тие кои одредуваат кој тип спектроскопија би бил најсоодветен. Некои од најчестите форми вклучуваат UV/Vis, колориметриски, флуориметриски, фотометриски или волуметриски методи.

Поради уникатната природа на трикомпонентниот производ и различните својства на секоја од компонентите во неговиот состав, потребни се три различни процедури за анализа. Оттука, за квантитативна анализа, UV спектроскопијата е најчеста спектроскопска техника, односно спектроскопска техника од избор. Притоа соединението мора да биде способно да апсорбира UV светлина на специфична бранова должина, која потоа ќе се користи за одредување на апсорпцијата на стандардните раствори и примероците за анализа. Во случај на резерпин, сите три соединенија мора да бидат специфично идентификувани, а задолжителна е и хроматографска сепарација. Хидрохлоротиазидот може да се одвои од резерпинот и хидралазинот, користејќи јоноизменувачка хроматографска колона. Понатаму, раствор со позната концентрација се анализира со UV спектроскопија и се споредува со стандарден раствор, при што се одредува количеството на хидрохлоротиазид присутно во примерокот за анализа. Исто така, за анализа на активните супстанции резерпин и хидралазин може да се користи UV спектроскопија, но примероците се подготвуваат со различни процедури. Покрај тоа, различни се и брановите должини на кои се врши мерењето. Според тоа може да се заклучи дека не постои пригоден начин да се испитаат сите три соединенија одеднаш, како резултат на што се наметнува потребата од три посебни постапки.

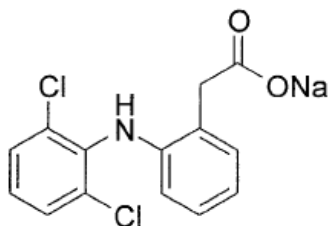
Производите што се достапни во форма на капсули имаат различни процедури за анализа поради природата на самата дозирана форма. Има случаи каде капсуларните тела се вклучени во подготовката на примерокот и се раствораат во медиумите, но во некои случаи содржината се отстранува од капсуларните тела и истите не се вклучуваат во анализата. Клофазимин е една од најактивните супстанции од класата деривати на феназин и првпат е синтетизиран од Бери и соработниците во 1957 година (Слика 8.). Се покажало дека оваа супстанција ја потиснува експерименталната туберкулоза кај глупци и заморчиња, но била уште поефикасна за лекување лепра.



Слика 8. Структура на клофазимин (Ahuja & Scypinski, 2001)

При тестот за определување на содржина на клофазимин капсуларните тела не се вклучени во подготовката на примерокот. Наместо тоа, капсуларните тела се празнат и се исплакнуваат за да се отстрани целиот прашок од примерокот. Добиените резултати од UV спектроскопската анализа на примероци со позната концентрација се споредуваат со стандардните раствори, па, врз основа на тоа, се утврдува количината на активна супстанција.

Друг пример за изведба на тестот за определување на содржина е анализата на диклофенак натриум, кој е синтетички лек со аналгетско и антиинфламаторно дејство, во форма на таблети со одложено ослободување (Слика 9.).



Слика 9. Структура на диклофенак натриум (Ahuja & Scypinski, 2001)

Диклофенак натриум претставува пример за производ чија содржина се определува со метод базиран на HPLC. HPLC методите имаат различен сет на барања во споредба со традиционалните UV методи, кои вообичаено се побрзи и полесно може да се спроведат (Guiffre, 1993). Пред да се започне со изведба на HPLC методот, прво се изведува прелиминарен тест, наречен тест за соодветност на системот, со цел да се осигура дека инјектирањата се репродуцираат, односно пиковите јасно се детектираат и меѓусебно се одвоени. На тој начин се потврдува дека хроматографскиот систем е подготвен за изведба на целната анализа. Тестовите за соодветност на системот вклучуваат одредувања на различни хроматографски параметри, како што се: резолуција, асиметрија или број на теоретски подови (Dorsey et al., 1998). Постапката може да содржи барања за поставените параметри, така што барањата мора да бидат исполнети пред да се започне со анализата. За време на тестот за соодветност на системот, вообичаено, се прават пет инјектирања од еден стандард за споредба, преку кој се пресметува отстапувањето помеѓу инјектирањата и се потврдува репродуктивноста на системот. Ако сите параметри се во рамки на бараните опсези, тогаш се вели дека „системот ја положил соодветноста“. Диклофенак натриум е специфичен по тоа што неговата форма е дизајнирана со одложено ослободување. Со напредокот во науката за сепарационите методи, HPLC претставува техника од избор и се користи речиси исклучиво при развој на нови производи (Adeyeye & Li, 1985).

1.4. Онечистувања

За да се одреди чистотата на лекот, потребно е да се спроведе тестирање за докажување на присуството на онечистувања. Постојат три категории онечистувања:

- органски онечистувања;
- неоргански онечистувања;
- резидуални растворувачи.

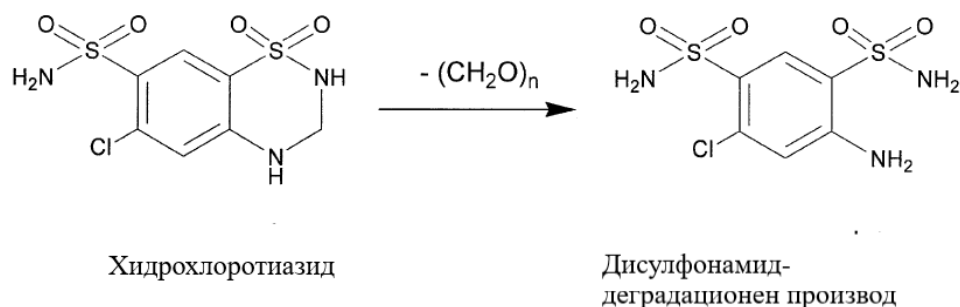
Освен ако тестот не е специфичен за одредено онечистување, постапките за испитување на онечистувањата, вообичаено, се одвиваат на исти или многу слични примероци и методи, како и оние користени при определување на содржината со HPLC. Ова е многу погодно бидејќи тестовите може да се извршуваат истовремено, зголемувајќи ја на тој начин ефикасноста.

1.4.1. Органски онечистувања

Органските онечистувања може да произлезат од синтезата на активната супстанција или од нејзиното разградување при складирање на готовиот производ во кој е инкорпорирана (Federal Register, 1997). Истите може да се класифицираат како идентификувани и неидентификувани. Идентификувани се оние чија структура е точно утврдена. Ако се достапни и токсиколошки податоци, овие онечистувања би можеле да имаат повисок лимит од 0,2%. Во спротивно, ако нема достапни токсиколошки податоци, критериумите на прифатливост во спецификациите е 0,1%. Од друга страна, неидентификувани онечистувања се оние чија структура и токсикологија се непознати, па критериумот за прифатливост во спецификациите е 0,1%. Органските онечистувања може да вклучуваат почетни материјали, нуспроизводи, полупроизводи, производи на разградба, реагенси, лиганди или катализатори. Темелното разбирање на хемиските реакции, условите на реакциите и секоја патека на метаболичка деградација е од

суштинско значење за идентификација на сите можни онечистувања (ICH Q3B, 1996; Nicolaou & Sorenson, 1996).

Хидрохлоротиазид има позната патека на деградација низ која се разградува до почетниот материјал од неговата синтеза, дисулфонамид (Слика 10.).



Слика 10. Деградација на хидрохлоротиазид до неговиот почетен материјал, дисулфонамид (Ahuja & Scypinski, 2001)

Дисулфонамидот е познато органско онечистување што, вообичаено, се наоѓа во прифатливи количини во конечната дозирана форма. Имено, за да се определи количеството на присутниот дисулфонамид, потребно е да се спроведе специфичен тест за ова онечистување со цел да се потврди дека количината е во рамките на прифатливо ниво. Кај таблетите хидрохлоротиазид, методот за определување на содржина и методот за тестирање на онечистувањата, вклучувајќи и подготовка на примероците, се изведуваат на ист начин, како резултат на што истите може да се спроведуваат истовремено. За таа цел се подготвува надворешен стандард со позната концентрација на дисулфонамид и снимените одговори на пиковите се користат за пресметување на количината на дисулфонамид во примерокот за анализа.

1.4.2. Неоргански онечистувања

Неорганските онечистувања најчесто произлегуваат од процесот на производство и, вообичаено, се познати и идентификувани. Генерално, неорганските онечистувања се одредуваат кога се анализира активната супстанција, а не во готовата дозирана форма. Тие вклучуваат реагенси, лиганди, катализатори, тешки метали и неоргански соли. Компендијалниот (фармакопејски) тест за испитување на овие типови на онечистувања се нарекува остаток при жарење. Истиот се користи за одредување количини на различни метали што може да настанат во текот на производствениот процес.

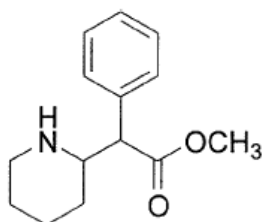
1.4.3. Резидуални растворувачи

Резидуалните растворувачи претставуваат растворувачи што се користат за време на производствениот процес и може да се откријат откако производот ќе биде во финална форма. Примери за ваков тип растворувачи се: бензен, хлороформ, 1,4-диоксан, метилен хлорид и трихлороетилен. Резидуалните растворувачи во активната супстанција или готовиот производ може да потекнуваат од различни фази на производствениот процес (гранулација на активната супстанција, мелење или обложување на готовиот производ). Бидејќи токсичноста на повеќето растворувачи е добро проучена, прилично лесно е да се избере соодветен метод на контрола за оние што може да бидат присутни во финалната дозирана форма. Најчесто употребувана техника за определување резидуални растворувачи е гасната хроматографија (GC), главно поради нивната мала молекулска маса и испарлива природа. Кај анализите базирани на GC, примерокот прво се испарува, а потоа се придвижува низ хроматографската колона со помош на гас-носач, кој се употребува како мобилна фаза. За точна идентификација и пресметка на количината на резидуален растворувач, потребно е да се подготват надворешни стандардни раствори на растворувачот и тие да се споредат со примероците за анализа.

Накратко, тестирањето на онечистувањата е неопходно за да се одреди чистотата на активната супстанција, односно на готовиот производ. Одредувањето на профилот на онечистувања бара познавања за синтезата, патеките на метаболичка деградација и сите употребени материјали во производството на активната супстанција.

1.5. Дополнителни тестови

Покрај четирите основни тестови за испитување на активните супстанции и готовите производи, дополнително може да се наметне потреба од изведба на тестови за определување на процентот на ослободената активна супстанција од дозираната форма, т.е. тест за растворливост. Тестот за растворливост е дизајниран да ги имитира *in vivo* интеракциите на лековите (Fyfe et al., 2000). Се изведува со помош на посебна апаратура за растворливост, која, вообичаено, содржи шест садови. Во зависност од производот кој се испитува, садовите може да содржат весла или корпи. Притоа веслата, односно корпите, се вртат со однапред дефинирана брзина, со цел да се обезбеди растворање на производот кој се испитува. По извесен временски период од секој сад се земаат аликвоти кои се анализираат со UV спектроскопија или со HPLC, така што концентрацијата се определува преку споредба со надворешен стандарден раствор. Генерално, при определување на растворливост се поставува само една временска точка во која се земаат мостри. Меѓутоа, за производи со бавно или временски зависно ослободување, примероците може да бидат анализирани во повеќе од една временска точка. Типичен пример за тоа е метилфенидатот, кој е достапен во форма на таблети со бавно ослободување (Слика 11.).



Слика 11. Структура на метилфенидат (Ahuja & Scypinski, 2001)

Тестот за растворливост на метилфенидат се спроведува во временски период од седум часа, така што примероците се земаат на секој час. Спротивно на тоа, тестот за растворливост на диклофенак натриум, кој е достапен во форма на таблета со продолжено ослободување, се спроведува во временски период од 18 часа, така што се земаат повеќе примероци и се прави промена на медиумот за растворање со цел да се симулира промена на рН вредноста од желудникот до гастроинтестиналниот тракт. Всушност, главната цел на тестот за растворливост е да се потврди дека активната супстанција се ослободува од дозираната форма во соодветното време.

Тестот за дезинтеграција се изведува во затворен систем – водена бања. Таблетите или капсулите се сместуваат во корпа која содржи шест отвори. Кошницата е сместена во чаша во која се наоѓа растворот за дезинтеграција. Бањата за дезинтеграција осцилира во правец нагоре-надолу и аналитичарот го евидентира времето кое е потребно за производот целосно да се распадне. На пример, за ослободување на производствените серии на карбамазепин таблети на пазарот, потребна е изведба на тестот за дезинтеграција.

Тестовите за цврстина и трошност се два дополнителни теста што, вообичаено, се изведуваат како контролни тестови за време на производствениот процес. Сепак, доколку цврстината и трошноста имаат критично влијание врз готовиот производ, тогаш истите треба да се испитуваат и при ослободување на производот на пазарот. На пример, при ослободување на производствените серии на пазарот на карбамазепин таблети за цваќање, задолжително е потребна изведба на тестот за цврстина, бидејќи цврстината е критичен параметар за ваквиот тип таблети.

1.6. Избор на соодветен компендиум

Денес фармацевтските компании се заинтересирани за дистрибуција на нивните производи на глобалниот пазар. Кога се поднесува апликација за регистрација на еден производ, повеќето компании го прават тоа истовремено во САД, Европа, Јапонија и Обединетото Кралство. Поднесената апликација за регистрација на нов фармацевтски производ ги содржи сите податоци и наоди од сите фази на клиничките испитувања. За готовиот производ што содржи нова активна супстанција, методите за тестирање ќе потекнуваат од фазата на развој, односно од процесот на откривање на лекот. Ако методите за тестирање се достават до фармакопеите, тие ќе станат компендијални методи.

Различни здравствени власти бараат различни спецификации или дополнителни тестирања за одреден производ што треба да се регистрира на пазарот. Тековните водичи, како, на пример, водичите на ICH, EMA и FDA, бараат да се користат методите што се поднесени во самото досие за регистрација. Тоа значи дека не мора да се користат компендијални методи и процедури за тестирање на квалитетот, но официјалните готови лекови мора да одговараат на соодветните стандарди поставени од компендиумите. Првично, кога регулаторните органи одобруваат нов лек на пазарот, нема официјални компендијални методи. Вообичаено, фармакопеите пристапуваат до производителот и ги бараат користените методи за тестирање, со цел истите да се вклучат во самите фармакопеи. Дури тогаш, доколку се обезбедат таквите методи за тестирање, тие стануваат официјални компендијални методи. Во спротивно, фармакопеите развиваат сопствени методи.

1.7. Валидација

Потврдувањето на аналитичката постапка е процес потребен за да се покаже дека постапката е погодна за нејзината намена (Riley & Rosanke, 1996). Речиси сите аналитички тестови бараат одреден вид валидација. Обемот и видот на валидацијата ќе зависи од процедурата за тестирање. За еден аналитички тест да стане рутински во лабораторија за испитување и контрола на квалитет, потребна е негова валидација. Водичите идентификуваат седум валидациски параметри: точност, прецизност, специфичност, лимит на детекција, лимит на квантификација, линеарност и опсег (ICH Q2(R1), 2005). Во зависност од тоа што се потврдува со тестот, при процесот на валидација се прават различни комбинации на валидациски параметри.

Точноста ја опишува блискоста помеѓу одговорот на вистинската вредност и утврдената вредност (ICH Q2(R1), 2005).

Прецизноста ја изразува блискоста на одговорот помеѓу низа мерења добиени од различни примероци кои потекнуваат од еден ист хомоген примерок. Постојат три различни нивоа на прецизност: повторливост, интермедиерна прецизност и репродуктивност. Вообичаено, прецизноста се изразува како варијанса, стандардна девијација или коефициент на варијација од низа мерења (ICH Q2(R1), 2005).

Специфичноста се однесува на способноста на тестот да го одвои анализот од интерес од другите компоненти во примерокот за анализа, како резултат на што недвосмислено се потврдува идентитетот на анализот. Кога тестот е дизајниран со цел да се анализираат онечистувања, анализот и секое познато онечистување мора да бидат меѓусебно одвоени. Единствено при испитување на параметарот содржина анализот од интерес мора да биде одвоен од онечистувањата, а онечистувањата не мора да бидат одвоени помеѓу себе (ICH Q2(R1), 2005).

Лимитот на детекција е најниската количина на анализ што може да се детектира, но не мора да се квантифицира како точна вредност (ICH Q2(R1), 2005).

Лимитот на квантификација е најниската количина на анализ што може квантитативно да се определи со соодветно ниво на точност и прецизност. Овој валидациски параметар, главно, се користи за определување на онечистувања и производи на деградација (ICH Q2(R1), 2005).

Линеарноста ја претставува способноста на аналитичката постапка да произведе резултати што се директно пропорционални со концентрацијата на аналитот во примерокот за анализа (ICH Q2(R1), 2005).

Опсегот е интервал во кој е докажано дека аналитичката постапка има соодветни нивоа на прецизност, точност и линеарност (ICH Q2(R1), 2005).

Дополнително, **робустноста** е мерка за веродостојноста и способноста на тестовите да останат незасегнати од мали промени во параметрите на методот на тестирање (ICH Q2(R1), 2005).

Регулаторните органи како ЕМА, FDA, USP и ICH обезбедуваат водичи во кои, за секоја постапка што се валидира, е утврдена соодветната комбинација на валидациски параметри. Како што се појавуваат новите технологии, постоечките методи на тестирање може да се заменат со понови методи. Притоа овие нови процедури, исто така, бараат соодветна валидација. Постојат и такви ситуации кога е потребна ревалидација на тековните методи. На пример, промените во синтезата на активната супстанција, промените во составот на готовиот производ или, пак, промените во самата аналитичка постапка, сами по себе, претставуваат доволни причини за ревалидација.

1.8. Хармонизација на методите за испитување при поднесување на досие за регистрација во повеќе земји истовремено

Во текот на последните неколку години е постигнат значаен напредок во здружувањето на регулаторните органи на Европа, Јапонија и САД. Главната цел е да се усогласат барањата за тестирања, валидациите на аналитичките процедури и валидациите поврзани со производствениот процес на готовите производи. Следствено, воспоставена е хармонизација на техничките барања при регистрација на фармацевтски производи за хумана употреба и сето тоа целосно е вклучено во Меѓународната конференција за хармонизација на техничките барања за регистрација на фармацевтски производи за хумана употреба (ICH). ICH е уникатен проект кој ги обединува горенаведените регулаторни агенции, како и експертите од фармацевтската индустрија, со единствена цел да дискутираат за научните и техничките аспекти при постапката за регистрација на производите. Всушност, се даваат препораки за начинот како да се постигне поголема усогласеност во толкувањата и примената на техничките водичи и барањата за регистрација на производот. Притоа е неопходно да се намалат двојните тестирања спроведени во текот на истражувањето и развојот на нови лекови, со цел да се забрза достапноста на новите производи. Зголеменото усогласување обезбедува поекономично користење човечки, животински и материјални ресурси, притоа елиминирајќи ги непотребните доцнења во глобалниот развој и достапноста на нови лекови, додека се одржуваат квалитетот, безбедноста, ефикасноста и регулаторните обврски за заштита на јавното здравје. Пред ICH секоја земја имаше свои барања за тестирање, па затоа одредени здравствени органи бараат повеќе тестирања и клинички испитувања во споредба со други. Од аспект на контрола на квалитетот тоа би значело дека еден производ треба да се тестира повеќепати, во зависност од тоа каде ќе се дистрибуира. Оттука, ICH се стреми да ги елиминира евентуалните разлики и да ги усогласи тестирањата така што ќе обезбеди еден сет оптимални и најефикасни тестови.

2. ЕВАЛУАЦИЈА НА АНАЛИТИЧКИ РЕЗУЛТАТИ ВО СОГЛАСНОСТ СО БАРАЊАТА НА СИСТЕМОТ ЗА УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТ

Барањата на системот за управување со квалитет (Quality Management System, QMS) кои се применливи за официјалните лаборатории за контрола на лекови (Official Medicines Control Laboratories, OMCL) во рамките на OMCL мрежата, се засноваат на стандардот ISO/IEC 17025 (ISO, 2017). За понатамошно разјаснување и олеснување на примената на таквите барања во рамките на OMCL мрежата развиена е серија придружни технички водичи. Овие водичи се базирани на научни сознанија и ја земаат предвид специфичната природа на работата на лабораториите во рамки на OMCL мрежата, која воедно се карактеризира со следново:

- Со исклучок на официјалното тестирање за ослободување на серии на вакцини, медицински производи добиени од крв и одредени имунолошки ветеринарни медицински производи, познато како Официјален контролен орган за ослободување на лек на пазар (Official Control Authority Batch Release, OCABR), OMCL, вообичаено, не се заснова на предрутинска програма за тестирање, базирана на фиксни аналитички методи. Наместо тоа, од OMCL се очекува, на дневна основа, да применуваат различни аналитички методи за анализа на различни медицински производи (и активни супстанции). Во овој поглед, постојат барања за валидација/верификација на методот што треба да се примени, кои се посебно развиени од страна на лабораториите во OMCL мрежата (EDQM, 2022a);
- Честопати, тестирањата мора да се извршат на ограничена количина примерок за анализа, па затоа при избор на тестовите што треба да се извршат потребно е да се примени пристап заснован на ризик. Ова, генерално, се одлучува со националниот надлежен орган;
- Од OMCL може да се очекува да го одреди идентитетот и составот на непознати примероци. На пример, при анализа на примероци кои би можеле да бидат фалсификувани.

Резултатите од испитувањата во OMCL се добиени од квалитативни, квантитативни и полуквантитативни анализи, извршени како дел од усогласеноста или други активности (како, на пример: скрининг, анализа на непознати производи, анализа на траги) (EDQM, 2020a). Сите активности при изведба на тестирањата во OMCL ги врши квалификуван персонал, користејќи соодветни референтни стандарди, калибрирана/квалификувана опрема и потврдени методи (во согласност со водичите за валидација/верификација на аналитички процедури) (EDQM, 2022a). Тестирањето за усогласеност опфаќа тестирање врз основа на претходно дефинирани критериуми за прифатливост во спецификацијата за квалитет, со користење официјални и/или соодветно потврдени методи (како, на пример, компендијални методи, методи опишани во документацијата на носителот на одобрението за ставање на лек во промет 'Marketing Authorization Holder, MAH' или методи развиени од страна на лабораториите) (Banes, 1974; EDQM, 2022b). При тестирањето на усогласеноста со примена на компендијални или методи опишани во документацијата на носителот на одобрението за ставање на лек во промет, добиените резултати се евалуираат во согласност со опишаната аналитичка процедура и водичите за известување, осигурувајќи дека се исполнети критериумите за соодветност на системот. За другите активности на тестирање (како, на пример, скрининг, анализа на непознати производи, анализа на траги), соодветноста на користените методи треба да се потврди и документира (во согласност со водичите за валидација/верификација на аналитички процедури) (EDQM, 2020a).

2.1. Евалуација на резултати

Сите анализи кои подлежат на регулаторни барања и се предмет на инспекции, треба да се работат во согласност со барањата за Добра лабораториска практика (Good Laboratory Practice, GLP) и Добра производствена практика (Good Manufacturing Practice, GMP) (MHRA, 2018).

Главен предуслов за Добра лабораториска практика и генерирање добри резултати, пред сè, претставува добро обучениот кадар, кој треба да биде квалификуван и компетентен за извршување соодветни задачи. Обезбедувањето репрезентативен примерок за анализа, добрата подготовка и ракување со истиот, како и употребата на референтни стандарди во рок на употреба, се, исто така, важни предуслови. Дополнителни предуслови за точно евидентирање и известување на резултатите претставуваат примената на квалификувани инструменти и примената на валидирани, робустни „stability indicating“ методи.

Евалуацијата на добиените резултати при тестирање на готов фармацевтски производ се врши на начин пропишан во работната методолошка процедура или, пак, на начин пропишан во официјалните монографии, во согласност со поставените критериуми за прифатливост. Доколку во овие документи не е пропишан точниот број повторени испитувања, за да се осигура точноста на добиените резултати потребно е нивната евалуација да се врши според интерни правила за Добра лабораториска практика, воспоставени во самите лаборатории. По обработка на резултатите добиени од анализата, аналитичарите проверуваат дали истите се движат во рамките на дозволените граници на отстапување, дадени во самата спецификација за квалитет на готовиот производ. Одговорноста за добивање точни резултати при изведба на лабораториски испитувања претставува должност на аналитичарот кој ја врши анализата. Поконкретно, аналитичарот е одговорен за стручно, квалитетно и точно спроведување на испитувањето, како и за целосно и точно документирање на сите резултати добиени во текот на тоа испитување. Аналитичарот треба да биде свесен за потенцијалните проблеми што може да се појават при изведба на анализата, односно треба да биде способен да ги воочи таквите проблеми, бидејќи истите може да придонесат за добивање неточни (атипични или дефектни) или несоодветни резултати. Сите записи во книгите за евиденција, записите за серијата на производот што се анализира, записите од лабораториската документација, аналитичките резултати и сета останата документација треба да бидат потпишани (верификувани) од страна на лицето кое ја изведува анализата.

2.1.1. Фаза на предтестирање

Фазата на предтестирање вклучува верификација на условите за генерирање валидни резултати од спроведените тестирања. Такви услови се: потврдување на постоењето на претходно дефинирани критериуми за прифатливост (вметнати во аналитичкиот метод и/или внатрешно воспоставени), верификацијата на параметрите на методот, статусот на валидација на методот и достапноста на ресурсите, т.е. квалификација на персоналот/опремата.

2.1.2. Фаза на тестирање

2.1.2.1. Верификација на методот

Првиот чекор од фазата на тестирање вклучува генерирање необработени податоци за верификација на методот, што опфаќа поставување на инструментот за работа, подготовка на раствори за докажување на соодветноста на системот, т.е. исполнување на критериумите за прифатливост. Како составен дел од аналитичките процедури, докажувањето на соодветноста на системот е од суштинско значење за верификација на методот и вклучува евалуација на вистинските услови за изведба на тестирањето (како, на пример, опрема, аналитички операции, анализирани примероци), според однапред дефинирани критериуми за прифатливост.

Критериумите за прифатливост може да се опишат во методот за тестирање или, пак, да се дефинираат во лабораторијата одговорна за контрола на квалитет на резултатите.

I. Критериуми за прифатливост опишани во методот за тестирање

Во методите на тестирање што се дадени во фармакопеите или во документацијата од производителот, освен што се опишани критериумите за прифатливост што треба да бидат задоволени при евалуација на соодветноста на системот, дефинирани се и барањата при трансфер на методот и испитувањата за контрола на квалитет на производот. Примери за критериуми за евалуација на соодветноста на системот за HPLC методите претставуваат: бројот на теоретски подови, резолуцијата, симетријата, прецизноста на инструментот и чувствителноста на методот (определена преку односот сигнал - шум). Стандардната прецизност се спроведува преку споредба помеѓу факторите на одговори добиени од два независно подготвени стандардни раствори (независни мерења) и, вообичаено, се применува како услов за контрола на квалитетот. За тестирање на усогласеноста потребно е да бидат исполнети критериумите за соодветност на системот, дефинирани во аналитичкиот метод. Сепак, отстапувањето од овие критериуми може да биде оправдано само ако научно се потврди дека истото нема да влијае на перформансите на методот и валидноста на конечните резултати. Секако, ваквото тврдење треба да биде соодветно документирано. Затоа, кога критериумите за прифатливост нема да бидат исполнети, лабораторијата е должна да ја испита причината за таквото неисполнување, па врз основа на тоа да продолжи или да прекине со тестирањето, но со појаснување до надлежниот орган.

II. Критериуми за прифатливост дефинирани во лабораторија

Независно од критериумите за прифатливост на аналитичкиот метод, лабораторијата треба да ги утврди барањата за контрола на квалитетот кои, во суштина, ги надополнуваат овие критериуми и на тој начин го обезбедуваат квалитетот на изведениот тест.

На пример:

- критериуми за параметрите при верификација на методот (прецизност, линеарност, точност);
- проценка на слепа проба (blank);
- прецизност меѓу подготвени пробни раствори добиени со мерење независни количини;
- тестови за точност;
- контролни графикони за евалуација на резултатите добиени при определување на параметарот содржина, што се користи за рутински анализи.

За други активности на тестирање (како, на пример, скрининг, анализа на непознати производи, анализа на траги) соодветноста на користените методи треба да се потврди и документира во согласност со водичите за валидација и/или верификација на аналитички процедури. Исто така, препорачливо е, при квантитативното тестирање да се изврши проценка на мерната неодреденост, кога тоа е соодветно, при што лабораторијата треба да го документира применетото правило за донесување одлуки. Примери за проценка на мерната неодреденост се дадени во OMCL водичот „Евалуација на мерна неодреденост“ (Evaluation of Measurement Uncertainty).

2.1.2.2. Генерирање необработени податоци од анализа на примерок

Вториот чекор од фазата на тестирање опфаќа генерирање необработени податоци од спроведената анализа на примерокот, како што се подготовката на растворите (референтни и пробни) и изведувањето на анализата во согласност со опишаната аналитичка постапка. Резултатите што се известуваат се засноваат на голем број независни определувања и набљудувања и треба да ги следат однапред дефинираните протоколи за тестирање, како и да бидат оценети според упатствата дадени во аналитичката постапка (EDQM, 2021).

Пред пријавување на резултатот, методот на тестирање или интерните процедури на лабораторијата треба да го предвидат бројот на независни определувања/репликации, начинот на нивна комбинација и пресметка, како и критериумите за валидација што треба да бидат потврдени (EDQM, 2021). Доколку во аналитичката постапка не е прецизно дефиниран бројот на независни определувања и постапката за евалуација на резултатите или, пак, ако се работи со интерно развиени методи на анализа, лабораторијата треба самостојно да го утврди и оправда бројот на независни определувања. Ова утврдување треба да се заснова на валидацијата на методот (доколку е достапна), видот на тестирањето (квалитативно или квантитативно) и факторите кои влијаат на мерната неодреденост. Во одредени случаи, како, на пример, при примена на скрининг методи, лабораторијата може да го определи бројот на независни определувања и надвор од рамките на валидираниот метод.

2.1.2.3. Преглед на необработените податоци

Овој чекор опфаќа евалуација на исправноста на изведените мерења, проверка на параметрите на интеграција и на добиените површини под пиковите (во случај на течна хроматографија), како и верификација на транскрипцијата на влезните податоци (како, на пример, вредности од мерења, површина под пикови, број на колони).

2.1.2.4. Пресметка на резултатите

Пресметката на резултатите може да се врши со употреба на рачни калкулатори или на верифицирани компјутеризирани системи, вклучувајќи табеларни пресметки во Excel, согласно Водичот за валидација на компјутеризирани системи (Validation of Computerized Systems) (EDQM, 2020b; European Commission, 2022a). Каде што е применливо, евалуацијата на мерната неодреденост треба да се спроведе во согласност со Водичот за евалуација на мерна неодреденост.

2.1.2.5. Пресметување на просекот и заокружување на резултатите

Пресметувањето на просекот на резултатите мора да се изврши според насоките наведени во методот за тестирање. Ако во методот за тестирање не е наведена постапка за пресметување на просекот, треба да се следат препораките дадени во OMCL, во кои јасно се дефинирани постапките. Пресметувањето на просекот зависи од примерокот и користениот метод. Во случаи на повеќе независни определби, каде што е потребен еден резултат за известување, како, на пример, при анализа на активна супстанција, просекот од овие повеќекратни анализи се смета како еден тест и претставува еден резултат за известување.

2.1.2.6. Проверка на валидноста на резултатите

За квантитативните резултати (т.е. генерирани нумерички вредности, без оглед на форматот на спецификациите), лабораторијата ги оценува добиените податоци според однапред дефинираните критериуми за прифатливост, наведени во методот (досието на МАН или интерна писмена процедура). Овие критериуми можат, на пример, да опфаќаат оценка на повторливоста помеѓу реплицираните резултати од квантитативното тестирање. Терминот „повторливост“ може да вклучува и дополнителни извори на варијабилност (како, на пример, мерења извршени во различни денови), во зависност од применетата процедура.

Овој чекор не се применува кога критериумите за прифатливост и активностите што треба да се преземат се веќе дефинирани во релевантните поглавја на Европската фармакопеја (како, на пример, тест за растворливост, распаѓање, воедначеност на дозирани единици) (European Pharmacopoeia Commission, 2024). Исто така, не се применува за квалитативно и полуквантитативно тестирање (компаративни методи), каде што варијабилноста не може да се процени.

2.2. Препораки од OMCL водичот за начин на евалуација на резултати

OMCL водичот дава повеќе општи препораки за начинот на евалуација и процена на резултатите при различни физичко-хемиски анализи, како што се: определување на содржината на активната супстанција, определување на онечистувања, содржина на активната супстанција во готовиот производ и определување на содржина во биолошки производи. Во Табела 1. се прикажани препорачаните пристапи за проценка на резултатите, заедно со примери за нивна можна примена.

Табела 1. Пристапи препорачани од OMCL за правилна проценка на добиените резултати (автор)

Пристап	Параметар / тип на примерок	Пример за примена на препорачаниот пристап
1	Содржина на активна супстанција – две определувања	Се применува само за хемиски активни соединенија.
2	Содржина на активна супстанција – три определувања	Се применува само за хемиски активни соединенија.
3	Онечистувања (сродни онечистувања определени со HPLC метода)	Се применува при користење на квантитативни методи за определување на онечистувања, каде аналитичкиот одговор е површина под пик.
4	Готови производи – определување на содржина на активна супстанција	Се применува кај готови производи со комплетна документација за добивање на Одобрение за ставање во промет (Marketing Authorization, MA), што вклучува валидирани аналитички методи, со посебен осврт на параметрите повторливост, метод прецизност и интермедиерна прецизност. <i>Не се применува кога аналитичката концентрација е многу ниска.</i>
5	Готови производи во процес на развој	Се применува кога нема доволно или воопшто нема податоци од валидацијата на процесот и/или методата, но е потребно да се дефинираат критериуми за прифатливост врз основа на прецизноста добиена со неколку последователни определувања. <i>Не се применува кога аналитичката концентрација е многу ниска.</i>
6	Ретестирање базирано на статистички тестови (Ph. Eur. 5.3)	Се применува при определување содржина во биолошки производи.
7	Ретестирање базирано на добро познати податоци од интермедиерната прецизност	Се применува при определување содржина на активна супстанција во готови производи со добро позната интермедиерна прецизност (на пример, во лаборатории авторизирани за анализа на производи за пуштање во промет 'Official Control Authority Batch Release, OCABR').
8	Случаи без објаснување за неповторливост на методот	Се применува кај производи каде не се утврдени проблеми со принос на примерокот (sample recovery) или нема прифатливи причини за појава на непрецизност на методот.

2.2.1. Евалуација на резултати при определување на содржина

Како пристап за евалуација на резултатите добиени при определување на содржина на активна супстанција во готов производ, најшироко применлив и од најголем интерес е **пристапот под реден број 4**. Истиот се користи за готови производи кои:

- имаат одобрение за ставање на лек во промет или се во фаза на регистрација;
- се предмет на следење во рамките на програмата за стабилност;
- поседуваат целосно завршено досие, кое ги содржи валидациите на методите.

Повторливоста на добиените резултати служи како индикатор за проверка на квалитетот на спроведената физичко-хемика анализа преку споредба со вредностите за параметарот повторливост, добиени при валидацијата на соодветниот аналитички метод.

Според OMCL водичот, евалуацијата на добиените резултати се спроведува во следните чекори:

- I. Пронаоѓање на вредноста за релативната стандардна девијација (%RSD) добиена од параметарот метод прецизност при валидација на аналитичкиот метод и внесување на таа вредност во Табела 2., Колона 1;
- II. Определување на содржината на активната супстанција од три примероци, пресметување на средната вредност и %RSD;
- III. Споредување на добиената вредност за %RSD од трите примероци со максимална прифатлива вредност за %RSD, определена врз основа на податоците во Табела 2. На пример, ако вредноста за %RSD од параметарот метод прецизност изнесува 1,30%, тогаш максималната прифатлива вредност за %RSD за три определувања ($df = 2$) е 3,13%;

Табела 2. Максимални прифатливи вредности за %RSD (maxRSD) во споредба со %RSD вредноста добиена од параметарот метод прецизност при валидацијата на аналитичкиот метод (автор)

Прецизност на методата (%) $v = 5$ (ICH)	$df = 2$	$df = 3$	$df = 4$	$df = 5$
0,40	0,96	0,93	0,91	0,90
0,50	1,20	1,16	1,14	1,12
0,60	1,44	1,40	1,37	1,35
0,70	1,68	1,63	1,59	1,57
0,80	1,92	1,86	1,82	1,80
0,90	2,17	2,09	2,05	2,02
1,00	2,41	2,33	2,28	2,25
1,10	2,65	2,56	2,51	2,47
1,20	2,89	2,79	2,73	2,70
1,30	3,13	3,02	2,96	2,92
1,40	3,37	3,26	3,19	3,15
1,50	3,61	3,49	3,42	3,37
1,60	3,85	3,72	3,65	3,60
1,70	4,09	3,95	3,87	3,82
1,80	4,33	4,19	4,10	4,04
1,90	4,57	4,42	4,33	4,27
2,00	4,81	4,65	4,56	4,49

df : степени на слобода

- IV. Евалуацијата на резултатите се врши врз основа на споредба помеѓу пресметаната %RSD и maxRSD наведена во Табела 2., како и според спецификациските граници за параметарот содржина.

Чекори и можни исходи:

- Во случај кога $\%RSD_3 \leq \max RSD$ и **средната вредност е во спецификациските граници**, пробните раствори одговараат и резултатите се прифатливи;
- Во случај кога $\%RSD_3 > \max RSD$ (**без оглед на тоа дали средната вредност е во спецификациските граници**), резултатот не се отфрла, но не се смета за релевантен, па потребна е дополнителна истрага за утврдување на причината за неповторливост;
- Во случај кога $\%RSD_3 \leq \max RSD$, **но средната вредност е надвор од спецификациските граници**, се вршат нови три определувања и се пресметува средната вредност и $\%RSD_6$ од сите шест определувања;
- Во случај кога $\%RSD_6 \leq \max RSD$ ($df = 5$) и **новата средна вредност е во спецификациските граници**, примерокот одговара и како релевантен резултат се зема средната вредност од сите шест определувања;
- Во случај кога $\%RSD_6 \leq \max RSD$ ($df = 5$), **но средната вредност е надвор од спецификациските граници**, се пресметува интервалот на толеранција (CI) на средната вредност, користејќи го следново равенство:

$$\bar{X}_6 \pm \frac{t_{(95\%,v)} \times \hat{\sigma}_v}{\sqrt{6}} \quad [1]$$

каде: $\hat{\sigma}_v$ претставува стандардна девијација од шест независни определувања; $t_{(95\%,v)}$ претставува табеларна вредност за t , која за $v = 5$ изнесува 2,57.

Интерпретација на CI:

- Ако ниту еден дел од CI не влегува во критериумот за прифатливост, примерокот не одговара;
- Ако само еден дел од CI влегува во критериумот за прифатливост, потребна е дополнителна лабораториска истрага;
- Ако CI целосно влегува во критериумот за прифатливост, резултатите се прифатливи.

Во готови производи за кои нема доволно податоци или аналитичкиот метод не е валидиран може да се користи **пристапот под реден број 5**, со цел да се постави критериум за прифатливост на методпрецизноста врз основа на последователни определувања.

На пример, доколку критериумот за прифатливост, наведен во спецификацијата за квалитет на готовиот производ, за параметарот содржина на активна супстанција, изнесува 95,0 – 105,0%, тогаш:

- централната вредност изнесува 100%;
- максималната грешка или проширената неодреденост (U) изнесува 5,0%;
- долната граница на прифатливост изнесува 95,0 % (100,0–5,0%);
- горната граница на прифатливост изнесува 105,0 % (100,0+5,0%).

Максималната грешка (U) е добиена од равенката:

$$U = 2 \times \mu \quad [2]$$

каде μ претставува релативна неодреденост (максимално очекувана вредност за $\%RSD$); во овој пример, $\mu = 2,5$ %.

Кај параметарот содржина на активна супстанција, апсолутната разлика помеѓу два резултати добиени од ист примерок (два независно подготвени пробни раствори), анализирани во иста лабораторија, од ист аналитичар и со употреба на ист инструмент, се пресметува според следново равенство:

$$r = 2,8\sigma_r \quad [3]$$

каде σ_r ја претставува стандардната девијација од повторливоста на методата.

Апсолутната разлика помеѓу два резултати добиени од ист примерок, анализиран во различни лаборатории, од различни аналитичари и со употреба на различни инструменти, се пресметува според следново равенство:

$$R = 2,8\sigma_R \quad [4]$$

каде σ_R ја претставува стандардната девијација од репродуктивноста на методата.

2.2.2. Евалуација на резултати при определување на параметарот воедначеност на дозирани единици

Кај параметарот воедначеност на дозирани единици, доколку добиениот резултат не ги задоволува поставените спецификациски граници, тестот се повторува на дополнителни 20 примероци. Целта е да се исполнат следниве услови:

- ниту еден од вкупно триесетте поединечни примероци не смее да има содржина пониска од 75,0% или повисока од 125,0% од декларираната содржина;
- вредноста за Acceptance Value (AV) мора да биде $\leq 15,0\%$.

2.2.3. Евалуација на резултати при определување на параметарот растворливост

Кај параметарот растворливост, доколку резултатот не ги исполнува критериумите за прифатливост наведени во спецификацијата за квалитет на готовиот производ, постапката продолжува според следниов распоред:

- I. *Тестирање нови дополнителни 6 дозирани единици од испитуваната форма (вкупно 12 дозирани единици)*, при што треба да бидат исполнети следниве критериуми за прифатливост:
 - средната вредност од сите 12 дозирани единици треба да биде еднаква или поголема од зададената спецификациска граница (Q);
 - ниту еден поединечен резултат не смее да биде понизок од Q–15%.

Во случај кога барем еден од горенаведените критериуми не е исполнет, се применува следниов чекор:

- II. *Тестирање нови дополнителни 12 дозирани единици од испитуваната форма (вкупно 24 дозирани единици)*, при што треба да бидат исполнети следниве критериуми за прифатливост:
 - Средната вредност од сите 24 дозирани единици треба да биде еднаква или поголема од зададената спецификациска граница (Q);
 - Не повеќе од 2 примерока смеат да имаат растворливост пониска од Q–15%;
 - Ниту еден поединечен резултат не смее да биде понизок од Q–25%.

2.2.4. Евалуација на резултати при определување на параметарот сродни и деградациски производи

За евалуација на резултатите добиени при определување на сродни и деградациони продукти може да се примени пристапот под реден број 3, со следниве чекори:

- I. Поставување максимална прифатлива вредност за релативната стандардна девијација (maxRSD) од 10% за сите онечистувања кои се над лимитот на квантификација или над прагот на известување (Reporting Threshold) (FDA, 1996);
- II. Определување на содржината на онечистувањата во три пробни раствора од готовиот производ;
- III. Квантификација на сите онечистувања кои се над лимитот на квантификација;
- IV. Пресметување на средната вредност и %RSD за секое поединечно специфицирано онечистување, за најголемото поединечно онечистување и за вкупните онечистувања.
- V. Евалуација на добиените вредности:
 - Во случај кога $\%RSD_3 \leq 10\%$ и **средната вредност е во спецификациските граници**, пробните раствори одговараат и резултатите се прифатливи;
 - Во случај кога претходниот услов не е исполнет, се подготвуваат три нови пробни раствори и се врши повторно определување. Потоа се пресметуваат средната вредност и %RSD од сите шест определувања;
 - Во случај кога $\%RSD_6 \leq 10\%$ и **средната вредност од сите шест определувања е во спецификациските граници**, пробните раствори одговараат, а за релевантен резултат се зема средната вредност од сите шест определувања;

- Во случај кога $\%RSD_6 \leq 10\%$, но **средната вредност од сите шест определувања не е во спецификациските граници**, пробните раствори не одговараат;
- Во случај кога $\%RSD_6 > 10\%$, резултатот не се отфрла, но не се смета за релевантен, па потребна е дополнителна истрага за утврдување на причината за неповторливост.

2.3. Постапки при добивање резултати што се надвор од спецификација (OOS), неочекувани, атипични (OOE) резултати и резултати надвор од тренд (OOT)

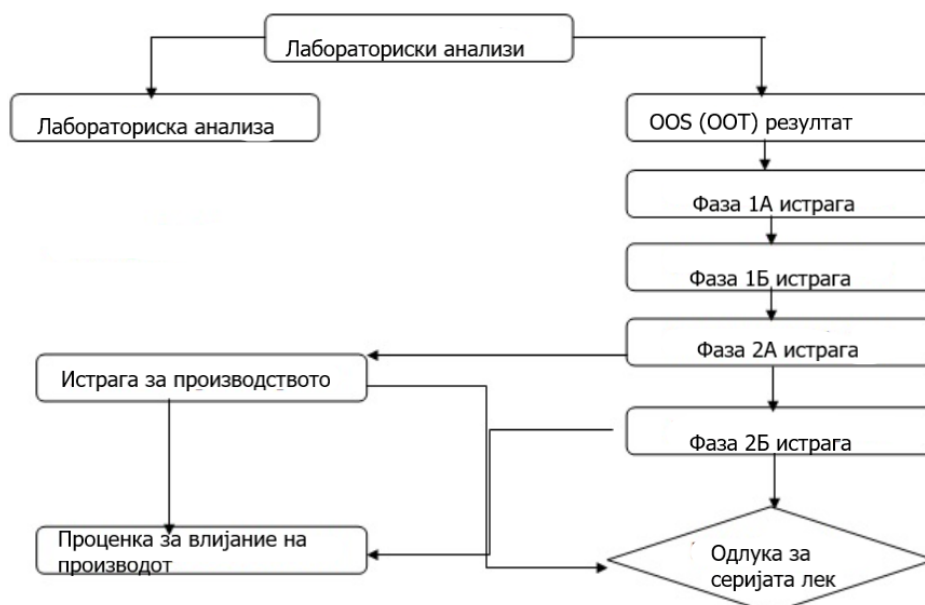
За обезбедување квалитетот на производот неопходно е континуирано следење и евалуација на податоците. Ова може да се постигне со примена на различни статистички алатки. Ваквото следење на трендот овозможува навремено откривање на потенцијални отстапувања пред тие да се развијат во реален проблем, давајќи подобар преглед врз веќе собраните и евалуирани податоци и олеснувајќи го управувањето со животниот циклус на производот и аналитичкиот метод.

Видови резултати што бараат дополнителна евалуација:

- **Резултати надвор од спецификацијата (Out of Specification, OOS):** резултати што не се во границите на спецификацијата за квалитет на готовиот производ, спецификацијата за активната супстанција дадена во соодветната документација или, пак, во интерно поставените критериуми за влезни материјали, *in-process* контроли, прелиминарни развојни спецификации, официјални монографии и др. (MHRA, 2014);
- **Неочекувани, атипични (Out of Expectation, OOE) резултати:** резултати кои се во границата на спецификацијата, но се неочекувани и значително отстапуваат од вообичаената низа резултати добиени при анализи во краток временски период;
- **Резултати надвор од тренд (Out of Trend, OOT):** резултати добиени во текот на студиите за стабилност кои не го следат очекуваниот тренд во споредба со други серии од истиот производ во текот на стабилноста или во споредба со претходно добиени резултати за стабилност на истата серија. Овие резултати, вообичаено, се во границите на спецификацијата, но се надвор од границите на прифатливост според статистичката контрола на процесот.

2.3.1. Резултати надвор од спецификацијата (OOS)

Во случај на идентификација на резултат надвор од спецификацијата, се започнува со спроведување на активностите прикажани на Слика 12.



Слика 12. Процес на истрага при третирање на OOS резултати (MHRA, 2018)

2.3.1.1. Фаза 1А: Почетна проверка

Првата фаза од истрагата вклучува првична оценка за точноста и валидноста на лабораториските (аналитички) резултати. Истрагата треба да биде: темелна, навремена, непристрасна, добро документирана и научно поткрепена (MHRA, 2014). Оваа фаза е одговорност на аналитичарот кој ја извршил анализата.

Најчести можни лабораториски грешки:

- Погрешно употребен референтен материјал (стандард) или примерок;
- Започнување со анализа пред да се постигне условот за соодветност на систем;
- Грешки во пресметките;
- Прекини во работата на опремата за време на анализата;
- Проблеми со инструментот кои бараат интервенција од сервис;
- Проблеми со HPLC или GC колона;
- Аналитички грешки при подготовка на примерокот (вагање, екстракција, филтрирање, разредување);
- Несоодветни или контаминирани лабораториски садови;
- Грешки во водењето евиденција во лабораториски дневници;
- Неточно креирана метода или неправилно поставени параметри на инструментот (бранова должина, проток, градиент и др.);
- Непостигнување на условот за соодветност на систем на почетокот или во текот на анализата.

2.3.1.2. Фаза 1Б: Продолжена истрага

Доколку во Фаза 1А не е идентификувана јасна лабораториска грешка или не се исполнети условите за соодветност на систем, се преминува на фаза 1Б. Оваа фаза е под надлежност на одговорното лице на лабораторијата и се спроведува врз основа на однапред дефиниран план, кој вклучува:

- *интервју со аналитичарот*: проверка на познавање на работната процедура и степен на обука за изведба на методот;
- *проверка на резултатите*: проверка на сите хроматограми, спектри и други аналитички податоци со цел идентификација на сомнителни вредности;
- *верификација на спецификацијата и методот*: проверка на важечката верзија (во развој или регулаторно прифатена);
- *проверка на опремата*: потврда дека опремата е квалификувана во рамките на дозволения период, преглед на записите за инструментите и колоните;
- *проверка на мострата*: проверка на условите на земање, репрезентативност, количина, пакување, означување и чување за време на анализата, односно дали мострата е чувана во оригиналното пакување, соодветно заштитена од влага и светлина, особено доколку е хигроскопна или фотосензитивна;
- *проверка на работните/референтните стандарди*: проверка на записите, резултатите и условите за соодветност на системот пред и за време на анализата;
- *проверка на лабораторискиот прибор*: проверка на неговата соодветност, чистота и сувост;
- *проверка на реагенсите/растворите*: проверка на нивниот рок на важност, сертификати за квалитет, записи за подготовка и мерење;
- *проверка на условите во работната средина*: влијание на времето на анализа, особено доколку истата се врши во текот на ноќта, влијание на температурата и релативната влажност;
- *проверка на оригиналните податоци*: се врши директно на инструментите, вклучувајќи ги сите забелешки;
- *проверка на историјата на параметарот*: преглед на претходни проблеми при анализа на истиот параметар за истиот производ;
- *пресметки и проценка на резултатите*: проверка на сите математички операции.

Секогаш кога ќе се идентификува лабораториска грешка, одговорното лице на лабораторијата мора да го утврди изворот (причината) за грешката и да предложи и спроведе соодветни корективни мерки со цел спречување на нејзино повторување. За полесно утврдување на причината се врши проверка на истите примероци, кои задолжително треба да бидат сочувани од повеќе причини. Одлуката за повторно тестирање мора да биде базирана на објективни и научно поткрепени аргументи. Ова е особено важно при предефинирање на планот за повторно тестирање, доколку се процени дека треба да се извршат измени, како, на пример, изведба на анализата од друг аналитичар, кој е искусен и квалификуван најмалку на исто ниво како првиот или, пак, доколку се процени дека има потреба, назначување постар и поискусен аналитичар. Примероците за повторно тестирање секогаш мора да потекнуваат од истиот оригинален материјал, односно од серијата од која потекнува OOS резултатот.

Повторното тестирање се врши на истите примероци, така што првично може да се изврши повторно инјектирање или повторно снимање. Доколку постои сомнеж во аналитичката подготовка на примерокот, се подготвува ново разредување од истиот примерок. Доколку со повторената анализа се добијат резултати во рамките на спецификацијата, тие се сметаат за валидни и се пријавуваат како крајни, под услов да постои целосно документирана истрага и официјална евиденција за резултатите. Бројот на повторно тестирани примероци се определува врз основа на интерна проценка и одлука на раководителот или водачот на тимот и е директно поврзан со природата на проблемот.

Лабораториските грешки треба да бидат релативно ретки. Честата појава на грешки укажува на потенцијален проблем кој може да биде резултат на несоодветна обука на аналитичарите, несоодветно одржување или некоректна квалификација на опремата или, пак, несовесно работење.

Сите оригинални резултати и забелешки мора бидат составен дел од аналитичкото досие за изведената анализа, со соодветна евиденција и означување како дел од оригиналниот сет на податоци. Во ниту еден случај не смеат да бидат прикриени или отфрлени (WHO, 2021a). Во одредени случаи, врз основа на заклучоците од Фаза 1А и Фаза 1Б, може да се донесе одлука да не се продолжува со истрага во Фаза 2. Постапката за повторно земање примерок не се изведува во оваа фаза, туку во наредната фаза од истрагата, и тоа само доколку не се утврди лабораториска грешка.

2.3.1.3. Фаза 2: Целосна лабораториска истрага

Доколку во претходната фаза не се донесе конкретен заклучок и не се идентификува лабораториска грешка, се започнува со Фаза 2 на истрагата. Во оваа фаза задолжително се известува Единицата за обезбедување на квалитет (Quality Assurance, QA), по што истрагата продолжува пообемно и подлабоко.

2.3.2. Неочекувани, атипични резултати (ООЕ)

Неочекувани, атипични резултати претставуваат резултати кои формално се наоѓаат во границите на спецификацијата, но се неочекувани, сомнителни или атипични.

Примери за ООЕ резултати:

- *Пример бр. 1:* Неочекувани варијации во последователни инјектирања на еден ист примерок (пробен раствор). Доколку не се исполнува критериумот за %RSD, дефиниран во аналитичкиот метод, истрагата е иста како во случај на непостигнување на условите за соодветност на систем. Се започнува лабораториска истрага со повторување на тестот, прво на истиот оригинален примерок, при што појавата се евидентира како лабораториска девијација;
- *Пример бр. 2:* Резултат кој не се совпаѓа со групата резултати добиени од еден тест или низа тестови на една иста серија, при што нема доволно податоци за да се направи статистичка обработка и да се утврди дали резултатот припаѓа на групата (според средната вредност и варијабилноста).

При донесување заклучок дали резултатот е неочекуван, атипичен, се земаат предвид варијабилноста на аналитичката метода и податоците добиени од нејзината валидација. Притоа, %RSD од интермедиерната прецизност се зема како индикатор за комбинираната стандардна неодреденост.

Проценката се изведува преку следниве чекори:

- I. %RSD од интермедиерната прецизност се множи со 1,5, при што се добива вредноста за комбинираната стандардна неодреденост;
- II. Според 95% ниво на доверба, добиената вредност се множи со фактор 2 (2σ), при што се пресметува проширената аналитичка неодреденост, односно опсегот во кој треба да се движат очекуваните резултати.

Заклучоци:

- Во случај кога сомнителниот резултат е во рамки на добиениот опсег, тогаш истиот не се смета за ООЕ;
- Во случај кога сомнителниот резултат е надвор од добиениот опсег, тогаш истиот се смета за ООЕ, па се спроведува истрага на ист начин како при третман на OOS резултати.

Пример за проценка на ООЕ, во случај кога за %RSD од интермедиерната прецизност е добиена вредност 1,3%:

- I. Добиената вредност (1,3%) се множи со фактор 1,5, при што за комбинираната стандардна неодреденост се добива вредност 1,95%;
- II. Добиената вредност (1,95%) се множи со фактор 2, при што за проширената аналитичка неодреденост се добива вредност 3,90%;
- III. Заклучок: 95 % од резултатите треба да се наоѓаат во опсегот $100\pm 3,90\%$.

2.3.3. Статистички *outlier* резултати

Тестирањето на *outlier* резултати е статистичка постапка за идентификација на резултат што значително отстапува од низата добиени резултати. *Outlier* може да произлегува од девијација во аналитичкиот метод или од варијабилноста на производот. Овој тест не се применува кога е докажана варијабилноста на производот, особено кај тестовите за воедначеност на дозирани единици и растворливост. Идентификување *outlier* во овие параметри имплицира неточен резултат, односно невоедначен производ. Како и сите лабораториски резултати, така и *outlier* вредностите мора да бидат документирани, аналитички да се интерпретираат и соодветно да се разрешат. Фактори кои треба да се земат предвид при истрага на *outlier* резултати претставуваат: човечка грешка, грешка на инструмент/опрема, грешка во пресметка, девијација во хомогеноста на производот, девијација во методот/постапката (Barnett & Lewis, 1994).

Доколку се утврди причина за *outlier* што не е поврзана со недостаток на производот, може да се спроведе повторно тестирање на истиот примерок (доколку е можно) или, пак, на нов примерок. Потребно е да се преиспитаат прецизноста и точноста на методот, употребените референтни стандарди, трендот на резултатите и границите на спецификацијата.

Доколку не е документирана можната причина за *outlier* резултатот, примерокот може да се тестира, како дел од целокупната истрага за да се утврди дали навистина станува збор за *outlier*.

Потребна е голема внимателност при донесување заклучок дали резултатот е *outlier* или не. Имено, секоја одлука за прифаќање/отфрлање на податоци во присуство на *outlier* бара внимателна, научно поткрепена интерпретација.

Постојат два типа грешки кои може да се јават при процена на *outlier*:

- *Погрешно декларирање*: случај кога резултатот се прогласува за *outlier*, а реално не е;
- *Неидентификување*: вистинскиот *outlier* не се препознава.

Декларирање на *outlier* претставува неформално препознавање на сомнителни лабораториски резултати за кои е потребно понатамошно испитување. Изборот на соодветна техника за декларирање зависи од целокупното познавање на животниот циклус на производот. Најчесто се врши визуелно, со употреба на графички техники за прикажување на податоците и откривање потенцијални отстапувања (Barnett & Lewis, 1994).

Идентификација на *outlier* подразбира примена на статистички значајни тестови со цел потврдување дали одредена вредност е во согласност со познатите или претпоставените граници. Кога се користат соодветно, овие тестови претставуваат корисна алатка за фармацевтските лаборатории, но не смеат да се користат како единствена основа за донесување одлука за квалитетот на производот или за издавање финален резултат. Најчесто користени тестови за идентификација на *outlier* се Grubbs тестот (Extreme Studentized Deviate Test 'ESD Test') и Dixon тестот (Q-Test) (Dean & Dixon, 1951).

2.3.3.1. Grubbs тест (Extreme Studentized Deviate Test 'ESD Test')

Grubbs тестот се изведува во две последователни фази.

Во првата фаза од тестот се пресметува најголемата апсолутна девијација на поединечна вредност од средната вредност на примерокот, нормализирана со стандардната девијација. За таа цел потребно е да се примени следново равенство:

$$G = \frac{|x_i - \bar{X}|}{s} \quad [5]$$

каде: x_i е поединечната вредност; \bar{X} е средната вредност на примерокот; s е стандардната девијација на примероците.

Добиената најголема апсолутна нормализациона вредност (G) се споредува со критичната вредност ($G_{\text{критично}}$), која се отчитува од статистичка табела (Табела 3.), во зависност од големината на примерокот (n) и нивото на доверба (вообичаено, 95%, $\alpha = 0,05$). Ако $G > G_{\text{критично}}$, тогаш резултатот се смета како екстремна вредност (*outlier*) (NIST/SEMATECH, 2012).

Во втората фаза од тестот вредноста која во првата фаза е идентификувана како екстремна вредност се исклучува од податоците. Постапката се повторува со преостанатите $n - 1$ резултати. Повторно се пресметува нова G вредност и се споредува со соодветната критична вредност, $G_{\text{критично}}$. Притоа, доколку новодобиената G вредност не ја надминува критичната, резултатот од првата фаза дефинитивно се потврдува како *outlier*.

Табела 3. Критични вредности ($G_{\text{критично}}$) за Grubbs тест (автор)

Број на примероци (n)	$\alpha = 0,05$; едностран тест	$\alpha = 0,05$; двостран тест
3	1,153	1,154
4	1,463	1,481
5	1,671	1,715
6	1,822	1,887
7	1,938	2,020
8	2,032	2,127
9	2,110	2,215
10	2,176	2,290
11	2,234	2,355
12	2,285	2,412
13	2,331	2,462
14	2,372	2,507
15	2,409	2,548
16	2,443	2,586
17	2,475	2,620
18	2,504	2,652
19	2,531	2,681
20	2,557	2,708

2.3.3.2. Dixon тест (Q-Test)

Dixon тестот претставува друг тест што се користи за идентификација на outlier резултати. Тестот најчесто се применува кога бројот на примероците е мал (како, на пример, од 3 до 7), но може да се користи и при групи од 10 до максимум 25 примероци. Основата на тестот е во мерење на односот помеѓу разликата на екстремната (сомнителна) вредност и нејзиниот сосед, и целокупниот ранг на податоците.

Прво сите резултати од групата се рангираат од најмала до најголема вредност, според низа: $x_1(\min), x_2, x_3 \dots, x_{k-2}, x_{k-1}, x_k(\max)$. Потоа тестот продолжува во две фази.

Во првата фаза се врши пресметка и првична идентификација на сомнителната вредност. Имено, во зависност од бројот на примероци (n) и од тоа дали сомнителната вредност е најмала или најголема, се користи соодветна равенка за пресметка на Q вредноста.

- Во случај кога **бројот на примероци е од 3 до 7:**

а) а екстремната вредност е најмалата, се користи равенката:

$$Q_{10} = \frac{|x_2 - x_1|}{|x_k - x_1|} \quad [6]$$

б) а екстремната вредност е најголемата, се користи равенката:

$$Q_{10} = \frac{|x_k - x_{k-1}|}{|x_k - x_1|} \quad [7]$$

- Во случај кога **бројот на примероци е од 8 до 10:**

а) а екстремната вредност е најмалата, се користи равенката:

$$Q_{11} = \frac{|x_2 - x_1|}{|x_{k-1} - x_1|} \quad [8]$$

б) а екстремната вредност е најголемата, се користи равенката:

$$Q_{11} = \frac{|x_k - x_{k-1}|}{|x_k - x_2|} \quad [9]$$

- Во случај кога **бројот на примероци е од 11 до 13:**

а) а екстремната вредност е најмалата, се користи равенката:

$$Q_{21} = \frac{|x_3 - x_1|}{|x_{k-1} - x_1|} \quad [10]$$

б) а екстремната вредност е најголемата, се користи равенката:

$$Q_{21} = \frac{|x_k - x_{k-2}|}{|x_k - x_2|} \quad [11]$$

- Во случај кога **бројот на примероци е од 14 до 25:**

а) а екстремната вредност е најмалата, се користи равенката:

$$Q_{22} = \frac{|x_3 - x_1|}{|x_{k-2} - x_1|} \quad [12]$$

б) а екстремната вредност е најголемата, се користи равенката:

$$Q_{22} = \frac{|x_k - x_{k-2}|}{|x_k - x_3|} \quad [13]$$

Добиената Q вредност се споредува со критичната вредност, $Q_{\text{критично}}$, која се отчитува од соодветна статистичка табела (Табела 4.), во зависност од големината на примерокот (n) и нивото на доверба (вообичаено, 95%, $\alpha = 0,05$). Ако $Q > Q_{\text{критично}}$, сомнителниот резултат се означува како потенцијален *outlier*.

Во втората фаза вредноста која во првата фаза е идентификувана како екстремна се исклучува од сетот на податоци, како резултат на што бројот на примероци станува $n - 1$. Понатаму се пресметува нова Q вредност за преостанатите податоци и повторно се споредува со критичната вредност, $Q_{\text{критично}}$, прочитана од соодветната табела. Доколку новата Q вредност не ја надминува критичната, тогаш екстремниот резултат од првата фаза се потврдува како *outlier*.

Табела 4. Критични вредности ($Q_{\text{критично}}$) за Dixon тест (автор)

Ранг	Број на резултати	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$
Од 3 до 7	3	0,988	0,941
	4	0,889	0,765
	5	0,780	0,642
	6	0,698	0,560
	7	0,637	0,507
Од 8 до 10	8	0,683	0,554
	9	0,635	0,512
	10	0,597	0,477
Од 11 до 13	11	0,679	0,576
	12	0,642	0,546
	13	0,615	0,521
Од 14 до 25	14	0,641	0,546
	15	0,616	0,525
	16	0,595	0,507
	17	0,577	0,490
	18	0,561	0,475
	19	0,547	0,462
	20	0,535	0,450
	21	0,524	0,440
	22	0,514	0,430
	23	0,505	0,421
	24	0,497	0,413
	25	0,489	0,406

2.3.3.3. Постапка при добивање на *outlier* резултати

Употребата на статистички тестови за идентификација на *outlier* резултати не смее да биде единствениот начин за нивно исклучување од анализата. Овие тестови можат да послужат како корисна алатка во процесот на евалуација, но нивното значење мора да се разгледува во контекст на сите достапни податоци. Одлуката за вклучување или исклучување на *outlier* резултатите во конечните пресметки, со цел да се оцени сообразноста со критериумите за прифатливост, треба да се заснова на научни проценки и интерни принципи на работа. Често е препорачливо пресметките да се изведат и со и без вклучување на *outlier*, со цел да се утврди нивното вистинско влијание врз резултатите. Во практичните апликации, особено во фармацевтските анализи, вредноста што е идентификувана како *outlier* понекогаш може да претставува реален резултат кој укажува на вистинска невоједначеност на производот. Затоа, сите податоци, а особено *outlier* вредностите, задолжително треба да се чуваат заради обезбедување целосен увид во историјата на производот.

Важно е да се нагласи дека *outlier* тестовите никогаш не можат да го заменат темелното лабораториско истражување. Тие претставуваат дополнителна алатка која најчесто се користи во случаи кога не е можно да се спроведе детална истрага или кога во производството и анализата не се забележани очигледни отстапувања. Дури и кога статистичкиот тест јасно укажува дека една или повеќе вредности се нерегуларни, тие податоци сепак треба да останат зачувани во евиденцијата.

2.4. Известување (прикажување) на аналитички резултати

Известувањето (прикажувањето) на аналитичките резултати од страна на лабораторијата се врши согласно поставениот план за анализа и дефинираните граници за прифатливост во спецификацијата за квалитет на готовиот производ. Бројот на пробни раствори и бројот на инјектирања (апликации) на секој пробен раствор зависи од параметарот кој се испитува, односно: идентификација, содржина, растворливост и/или сродни и деградациски продукти.

Првиот чекор е пресметка на индивидуалниот резултат од аналитичкиот одговор (површина под пик, апсорбанца, потрошен волумен на титрант и слично).

Како краен резултат, вообичаено, се известува (прикажува) средната вредност од сите индивидуални резултати. Сепак, многу е важно да се има предвид каде е потребно да се известува (прикажува) средната вредност, а каде индивидуалниот резултат. Средна вредност не се известува (прикажува) при испитување на параметарот воедначеност на дозирани единици. Во тој случај се определува стандардната девијација, со цел да се оцени варијабилноста на производот.

Со цел хармонизација при евалуација и известување (прикажување) на резултати, потребно е да се применуваат следниве правила на заокружување:

- **Индивидуалните резултати не се заокружуваат;**
- **Секогаш се заокружува финалниот резултат, односно резултатот што се известува (прикажува) според барањата дефинирани во спецификацијата за квалитет на готовиот производ, за соодветниот параметар:**
 - I. Растворливост: без децимални места (на пример, граница на спецификација: не помалку од 75%);
 - II. Содржина на активна супстанција: на една децимала (на пример, граница на спецификација: 95,0–105,0%);
 - III. Воедначеност на дозирани единици: на една децимала (на пример, граница на спецификација: не повеќе од 15,0%);
 - IV. Сродни и деградациски продукти: според поставениот праг на известување во аналитичкиот метод, односно:
 - за онечистувања помали од 1,0%: на две децимали (на пример: 0,05%, 0,01% итн.);
 - за онечистувања еднакви или поголеми од 1,0%: на една децимала (на пример: 1,0 %, 1,5%, 2,0% итн.).

Индивидуалните резултати за онечистувањата, во зависност од лимитот на квантификација, може да се известуваат (прикажуваат) со повеќе децимални места. Во развојните фази на производот, со цел генерирање подетални информации и знаења за сродните и деградациски продукти, како финален резултат е дозволено известување и со три или повеќе децимални места.

Во Табела 5. се наведени основните правила за заокружување на аналитичките резултати.

Табела 5. Основни правила за заокружување на аналитичките резултати (автор)

Реден број	Објаснување	Визуелен приказ
1	Доколку бројката што следи (Y) по финалната (X) е 4 или помала од 4, финалната бројка останува непроменета.	
2	Доколку бројката што следи (Y) по финалната (X) е 5 или поголема од 5, финалната бројка се зголемува за 1.	
3	Ако бројот што се заокружува е точно 5, доколку постојат дополнителни цифри (Z) по финалната бројка кои се поголеми од 0, финалната бројка се зголемува за 1.	
	Ако бројот што се заокружува е точно 5, доколку сите дополнителни цифри (Z) се еднакви на 0, финалната бројка останува иста.	

При користење различни софтвери за пресметка на резултатите можно е да се појават разлики во последното децимално место, зависно од алгоритмот што софтверот го користи за заокружување.

3. ЕВАЛУАЦИЈА НА МЕРНА НЕОДРЕДЕНОСТ КАЈ АНАЛИТИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА

3.1. Основи за мерната неодреденост

Генерално, поимот „мерна неодреденост“ се дефинира како параметар поврзан со резултатот од мерењето, кој ја карактеризира дисперзијата на вредностите што разумно може да му се припишат на она што се мери. Овој параметар може да биде, на пример, стандардна девијација или ширина на интервал на доверба.

Мерната неодреденост опфаќа повеќе компоненти. Дел од нив се проценуваат преку статистичка дистрибуција на резултатите од серији мерења и се карактеризираат со стандардни отстапувања, а дел се базираат на претпоставени распределби на веројатност врз основа на искуство или дополнителни информации.

Резултатот од мерењето претставува најдобра проценка за вистинската вредност, при што сите компоненти на неодреденост придонесуваат за дисперзијата, вклучувајќи ги и оние кои потекнуваат од систематски ефекти (корекции, референтни стандарди и сл.).

Во хемиските анализи најчесто мерната величина е концентрацијата на аналитот, но во поширок контекст може да се мерат и други параметри (како, на пример, боја, рН и сл.), па затоа се користи општиот поим мерење.

Дефиницијата за мерна неодреденост, дадена погоре, се фокусира на опсегот на вредности што аналитичарот разумно може да ги припише на мерната величина. Во секојдневната употреба терминот неодреденост често се поврзува со основниот концепт на сомнеж. Сепак, во контекст на ова поглавје, зборот неодреденост се користи во потесно значење: како параметар поврзан со дисперзијата на можните вредности (според дадената дефиниција) и како израз на ограниченото значење за точната вредност на одредена величина. Значи, мерната неодреденост не означува сомнеж во валидноста на мерењето. Напротив, познавањето на неодреденоста ја зголемува довербата во добиениот резултат.

При проценка на вкупната неодреденост секој можен извор на неодреденост може да се разгледува одделно, со цел да се утврди неговиот поединечен придонес во неодреденоста. Притоа, секој ваков поединечен придонес се нарекува *компонента на неодреденост*. Кога компонентата се изразува во форма на стандардна девијација, таа се дефинира како *стандардна неодреденост*. Во случај кога постои корелација меѓу одделните компоненти, тогаш истата мора да се земе предвид преку проценка на коваријансата. Во пракса честопати се врши евалуација на комбинираниот ефект на неколку компоненти истовремено. Како резултат на тоа се намалува вкупниот напор при определување на неодреденоста, бидејќи компонентите, чиј придонес се разгледува во комбинација, не бараат дополнителна индивидуална проценка за корелацијата.

3.2. Аналитичко мерење и неодреденост

Во пракса соодветноста на аналитичките методи што се применуваат за рутинско тестирање најчесто се оценува преку спроведување студии за валидација на методите. Таквите студии обезбедуваат податоци за целокупните перформанси на методот, како и за поединечните фактори на влијание, кои потоа можат да се искористат за проценка на неодреденоста поврзана со резултатите при негова нормална примена. Студиите за валидација се фокусираат на утврдување на вкупните параметри на перформансите, кои, вообичаено, се добиваат во фазата на развој и оптимизација на методот во рамките на една лабораторија. Поединечните извори на грешки или неодредености се разгледуваат само доколку се значајни и имаат влијание врз целокупната прецизност на методот. Пристапот е насочен кон идентификација и елиминација, наместо кон корекција на најзначајните ефекти. Како резултат на тоа најголемиот дел од потенцијално значајните фактори на влијание се идентификувани, проценети за нивната значајност во однос на вкупната прецизност и, доколку се утврди дека немаат големо влијание, тие се занемаруваат. Со тоа достапните податоци за аналитичарите се состојат првенствено од информации за перформансите на методот, поткрепени со докази за незначајноста на повеќето ефекти и со податоци за сите преостанати значајни фактори.

Тестирањето на усогласеноста подразбира споредба на резултатите со претходно дефинираните граници на спецификацијата, при што се користат официјални и/или соодветно валидирани методи (како, на пример, компендијални методи, методи опишани во документацијата за добивање решение за ставање на лек во промет или, пак, интерно развиени методи).

Компендијалните методи и методите опишани во регистрациската документација претставуваат добро признати аналитички методи, валидирани во согласност со прифатената научна практика и тековните препораки за валидација на аналитичките методи. Нивната прецизност (интермедиерна прецизност и повторливост) е добро позната и директно се одразува во поставувањето на границите на перформансите на методот. За овие методи изворите на неодреденост се добро идентификувани и земен предвид уште при дефинирањето на границите на спецификацијата. Поради тоа, при тестирање на усогласеноста барањата на ISO 17025 за евалуација на мерната неодреденост се сметаат за исполнети доколку резултатите се добиени со строго следење на пропишаната аналитичка постапка и упатствата за известување. Ова важи под услов сите фактори што придонесуваат за неодреденоста да бидат под целосна контрола, односно: тестирањето да се изведува од квалификуван персонал, да се користат соодветни референтни стандарди и калибрирана/квалификувана опрема, критериумите за соодветност на системот да бидат исполнети и повторливоста да се оценува според однапред дефинираните критериуми на прифатливост. За компендијалните методи не е потребно да се применуваат дополнителни толеранции (како, на пример, добиени при проценка на мерната неодреденост или со утврдување на зони на отфрлање/прифаќање) врз пропишаните граници за да се утврди дали испитуваниот производ е во согласност со барањата на монографијата. Истото важи и за методи опишани во регистрациската документација за добивање решение за ставање лек во промет. Кај овие методи лабораторијата може самостојно да одлучи во кои случаи ќе ја проценува и зема предвид мерната неодреденост при поставување на критериумите за прифатливост во спецификациите за испитување и контрола на квалитетот.

Алтернативно, методите за анализа развиени во рамките на компанијата може да се применат при тестирање на усогласеност под услов да се соодветно валидирани за намената за која се користат и да овозможуваат недвосмислено донесување одлука за усогласеност. Во овие случаи е неопходно да се земе предвид проценетата мерна неодреденост. Донесената одлука треба да биде соодветно документирана, при што се зема предвид нивото на ризик поврзано со применетото правило за одлучување, како и ризикот од донесување погрешна одлука.

Постојат ситуации кога е потребна поригорозна евалуација на мерната неодреденост, како, на пример, при:

- користење на *ad-hoc* методи (како, на пример, скрининг, анализа на непознати производи, анализа на траги);
- примена на методи со непознати или нецелосни информации за неодреденоста;
- потврдување резултати што не се во согласност со спецификациите, особено кога тестот не може да се повтори;
- поставување граници за перформансите на мерните инструменти и критичните параметри на методите.

Степенот на познавање и разбирање на аналитичкиот метод е клучен за правилна идентификација на релевантните фактори што придонесуваат кон мерната неодреденост, како и за избор на најсоодветниот пристап за нејзина евалуација.

За аналитички метод што се користи рутински во лабораторијата, а за кој мерната неодреденост на резултатите е веќе утврдена и потврдена, не постои потреба од повторна евалуација на неодреденоста за секој поединечен резултат, доколку лабораторијата може да демонстрира дека сите идентификувани критични фактори на влијание се под контрола, во согласност со ISO 17025. Таквите фактори вклучуваат: изведување на тестирањето од квалификуван персонал, користење соодветни

референтни стандарди и калибрирана/квалификувана опрема, исполнување на критериумите за соодветност на систем, оценување на повторливоста според однапред дефинирани критериуми за прифатливост. Сепак, лабораторијата може да одлучи да спроведе евалуација на мерната неодреденост како дополнителен индикатор за внатрешна контрола на квалитетот секогаш кога тоа ќе се смета за неопходно.

3.3. Општ пристап за евалуација на мерната неодреденост

Процесот на евалуација на мерната неодреденост опфаќа четири основни чекори:

- I. **Идентификација на мерната величина;**
- II. **Идентификација на факторите што придонесуваат за неодреденоста;**
- III. **Квантификација на неодреденоста;**
- IV. **Пресметка на комбинираната и проширената неодреденост.**

Во првиот чекор мерната величина мора да биде јасно и недвосмилено дефинирана. Притоа е потребно да се определи квантитативниот израз што се однесува на вредноста на мерната величина, аналитичката постапка за нејзино определување и основата за пресметка на величината (доколку е потребно).

Во вториот чекор сите релевантни извори на неодреденост треба да се идентификуваат и документираат. За таа цел може да се користи дијаграм на причинско-последична врска (Ишикава дијаграм). Во оваа фаза поединечните компоненти не се квантификуваат, туку само се издвојуваат.

Според Eurachem/CITAC и EA 4/16 водичите, квантификацијата на мерната неодреденост во третиот чекор може да се изврши преку два пристапа:

- **Пристап од долу нагоре (Bottom-up approach):** Се применува кога постојат ограничени или никакви податоци за перформансите на методот. Неодреденоста од секој поединечен извор се оценува преку повторувачки мерења, а потоа се комбинира со статистички методи (EDQM, 2020c);
- **Пристап од горе надолу (Top-down approach):** Се применува кога постојат доволно податоци за перформансите на методот. Комбинираните придонеси кон неодреденоста се проценува со користење податоци за перформансите на методи, како што се:
 - *сертифицирани референтни материјали;*
 - *податоци од студии за валидација;*
 - *резултати од колаборативни студии* (како, на пример, воспоставување референтни стандарди или валидација на нов метод);
 - *податоци од PTS (Proficiency Testing Schemes) студии*, кои се форма на надворешна проценка на системите за управување со квалитетот преку меѓулабораториски споредби со кои се оценува ефикасноста на лабораториите во спроведување на специфични тестови или мерења;
 - *контролни графיקони (карти)*, кои обезбедуваат податоци што се користат за проценка на мерната неодреденост на избраниот тест или метод, особено во однос на споредлива прецизност, задоволителни перформанси на системот (т.е. соодветност на системот) и резултати од контрола на квалитетот во согласност со утврдените критериуми за аналитичка прифатливост (EDQM, 2020d).

Во пракса најчесто се применува комбинација од двата пристапа (Bottom-up и Top-down), што претставува практично и ефикасно решение.

Во четвртиот и последен чекор се врши пресметка на комбинираната неодреденост од сите компоненти изразени како стандардни девијации. Комбинираната стандардна неодреденост потоа се множи со избраниот фактор на покриеност (k), со цел да се добие проширената неодреденост. Проширената неодреденост овозможува утврдување интервал во кој со висока веројатност е опфатен значаен дел од распределбата на можните вистински вредности на мерната величина.

3.4. Одлука за усогласеност на резултатот од тестот, земајќи ја предвид мерната неодреденост

Според ISO 17025:2017 лабораторијата треба јасно да го дефинира правилото за одлука кое прецизира на кој начин мерната неодреденост ќе се земе предвид при утврдување на усогласеност со одредено барање (ISO, 2017). Во ситуации кога правилото за одлука не е однапред пропишано од страна на регулаторен орган, производител, пропис, стандард или водич, потребно е лабораторијата да изврши проценка на нивото на ризик при донесувањето одлука за прифаќање или отфрлање на резултатот (вклучувајќи ги и релевантните статистички претпоставки). Правилото за одлука треба да биде јасно комуницирано и договорено со клиентот, освен доколку истото не е веќе својствено и дефинирано во ограничувањата на спецификацијата. За поставување на правилата за донесување одлуки може да се користат пристапите предложени во Eurachem/CITAC Водичот „Употреба на информации за неодреденост во проценка на усогласеноста“ (прво издание, 2007) и/или Eurolab Техничкиот извештај „Правила за донесување одлуки применети за проценка на усогласеноста“ (2017).

3.5. Известување на резултат со мерна неодреденост

Мерната неодреденост треба да биде наведена во извештајот од тестирањето во следниве случаи:

- кога е релевантна за валидноста на резултатот;
- кога може да влијае на усогласеноста со спецификациската граница;
- кога тоа експлицитно го бара клиентот.

Сепак, и кога не е изречно наведена во извештајот, проценетата мерна неодреденост треба да биде достапна и документирана, со можност за следење на суровите податоци.

Резултатот треба да се прикаже заедно со вредноста на мерната неодреденост, која најчесто се изразува како проширена неодреденост (U) во истата единица како и мерната величина или како релативна вредност во однос на неа, со формулацијата: „ $X \pm U$ (единица), за $k =$ (вредност) и ниво на доверба = (вредност)“. На пример, за $k = 2$, нивото на доверба изнесува приближно 95%.

Алтернативно мерната неодреденост може да се прикаже како комбинирана стандардна неодреденост (U_c), со формулацијата: „ X (единици) [со] стандардна неодреденост од U_c (единици)“. Важно е да се нагласи дека употребата на симболот \pm не се препорачува при изразување на стандардната неодреденост, бидејќи овој симбол најчесто се поврзува со интервали кои одговараат на високи нивоа на доверба (како, на пример, 95%).

3.6. Проценка на мерната неодреденост со примена на пристапот од долу нагоре (Bottom-up approach)

Кога мерната величина Y (излез) се определува од влезните променливи X_1, X_2, \dots, X_n преку функционална зависност ($Y = f(X)$), тогаш неодреденоста на влезните променливи се пренесува (пропагира) во резултатот Y .

Комбинирањето на стандардните неодредености ($u(X)$) за секоја влезна променлива резултира со комбинирана стандардна неодреденост ($U_c(Y)$), која се добива со соодветни математички правила. Вообичаено, влезните променливи се независни една од друга, освен преку нивната функционална врска што ја дефинира Y . Доколку постои корелација меѓу променливите, таа мора да се земе предвид со вклучување на коваријансата во пресметката.

Проценката на мерната неодреденост со примена на пристапот од долу нагоре (Bottom-up) подразбира идентификација на секоја поединечна компонента на неодреденоста, а потоа и пресметка на вкупната комбинирана неодреденост, преку собирање на придонесите на сите релевантни извори (EDQM, 2020c).

Неодреденоста може да произлегува од повеќе извори. Нивниот индивидуален придонес треба да се третира посебно. Сепак, не сите компоненти имаат значаен придонес. Прифатено е дека ако одредена компонента е помала од една третина од доминантната компонента, таа може да се занемари без значително влијание врз конечната процена. Кога неодреденоста е изразена како стандардна девијација, таа се нарекува стандардна неодреденост. Оттука, лабораторијата има задача да направи научно оправдана проценка и да одлучи кои компоненти се суштински за конечната пресметка на вкупната неодреденост.

3.6.1. Процена на мерната неодреденост со пристапот од долу нагоре (Bottom-up) при одредување на концентрацијата на тироидниот ослободувачки хормон (TRH) во раствор

За подобро разбирање на практичната примена на пристапот од долу нагоре (Bottom-up), во продолжение е даден пример за проценка на мерната неодреденост при подготовка на стандарден раствор на хормонот што ослободува тиротропин (L-пироглутамил-L-хистидил-L-пролинамид), односно тироидниот ослободувачки хормон (TRH) (EDQM, 2020c).

Овој пример може да се разгледува на два начина, односно како самостојна илустрација за тоа како се проценува мерната неодреденост при подготовка на раствор на TRH или, пак, како дел од поширока проценка, на пример, кога TRH се определува во готов производ. Во таков случај подготвениот стандарден раствор се користи како референтен материјал за квантификација, па неговата мерна неодреденост станува составен дел од вкупната неодреденост на анализата.

I. Опис на аналитичката постапка (подготовка на раствори)

Подготовка на основен раствор на TRH: Основниот раствор се подготвува со внимателно мерење и растворање на 19,5 mg (точна маса) сертифицирана референтна супстанција на TRH во волуметриска колба од 500,0 mL, при што се добива раствор со концентрација од 0,105 mM.

Подготовка на конечен раствор на TRH: Конечниот раствор со концентрација од 0,0105 mM се добива со прецизно префрлање на 10,0 mL од основниот раствор во волуметриска колба од 100,0 mL, по што се разредува со вода до ознаката (100,0 mL).

II. Проценка на мерната неодреденост

Чекор 1: Спецификација на мерната величина

Мерната величина е концентрацијата на TRH во конечниот раствор, изразена како mol/L. Таа се пресметува според следново равенство:

$$C_{TRH} = \frac{m \times P_{TRH}}{M} \times \frac{1}{500} \times \frac{10}{100} \quad [14]$$

каде:

- **m**: маса (mg) на сертифицираната референтна супстанција на TRH, употребена за подготовка на основниот раствор;
- **P_{TRH}**: чистота на TRH (бездимензионална величина, изразена како децимален број);
- **M**: моларна маса на TRH (g/mol);
- **500**: волумен на основниот раствор (mL);
- **10**: волумен на основниот раствор што се користи за разредување (mL);
- **100**: конечен волумен на разредување (mL).

$$u(m_{st}) = \sqrt{2 \times (0,04)^2 + (0,09902)^2} = 0,11402 \text{ mg}$$

Оттука, релативната стандардна мерна неодреденост на масата на стандардната супстанција изнесува:

$$\frac{u(m_{st})}{(m_{st})} = \frac{0,11402 \text{ mg}}{19,5 \text{ mg}} = 0,00585$$

Вториот извор на неодреденост претставува *чистотата на TRH*. Во сертификатот за анализа добавувачот ја наведува чистотата на TRH како $97 \pm 3\%$, без прецизирање на нивото на доверба и видот на распределбата. При проценка на чистотата како извор на неодреденост, конвенционално се претпоставува правоаголна распределба. Поради тоа наведениот интервал се дели со квадратниот корен од 3, како резултат на што се добива стандардната неодреденост на чистотата, $u(P_{TRH})$:

$$u(P_{TRH}) = \frac{3\%}{\sqrt{3}} = 1,73\%$$

Оттука, релативната стандардна мерна неодреденост на чистотата на стандардната супстанција изнесува:

$$\frac{u(P_{st})}{(P_{st})} = \frac{1,73\%}{97\%} = 0,0178$$

Со цел да се обезбеди точна проценка, потребно е да се искombинираат релативните придонеси од мерењето на масата и чистотата на TRH. Резимето на поединечните вредности е прикажано во Табела 7.

Табела 7. Резиме на вредностите на неодреденост на масата на TRH (EDQM, 2020c)

Опис	Вредност (X)	U(X)	$\frac{U(X)}{X}$
Чистота на TRH	97%	1,73%	0,0178
Маса на TRH	19,5 mg	0,11402 mg	0,00585

Врз основа на вредностите во Табела 7., се врши комбинирање на релативните придонеси за да се пресмета стандардната неодреденост на масата на TRH:

$$\frac{u(m_{TRH})}{m_{TRH}} = \sqrt{(0,00585)^2 + (0,0178)^2} = 0,0187$$

За да се обезбеди усогласеност, неодреденоста се пресметува во истата мерна единица (mg) како и добиениот резултат, односно:

$$u(m_{TRH}) = 0,0187 \times 19,5 \text{ mg} = 0,3654 \text{ mg}$$

Третиот извор на неодреденост претставува *волуменот на разредување на стандардниот раствор*. Овој извор вклучува три дополнителни фактори: калибрацијата на волуменот, повторливоста на мерењата и температурниот ефект.

Според сертификатот на производителот, неодреденоста од калибрацијата на волуменот за волуметриската колба е наведена како $500,0 \text{ mL} \pm 0,12 \text{ mL}$, на температура од $20 \text{ }^\circ\text{C}$, без никакви информации во врска со нивото на доверба или распределба. Се претпоставува триаголна распределба, бидејќи поверојатно е дека вистинскиот волумен ќе биде во центарот, отколку во екстремите на опсегот. Затоа, неодреденоста од калибрацијата на волуменот изнесува:

$$u(V_{cal}) = \frac{0,12}{\sqrt{6}} = 0,05 \text{ mL}$$

Понатаму неодреденоста поврзана со повторливоста на мерењата на волуменот е проценета врз основа на серија од десет полнења и мерења на волуметриската колба од $500,0 \text{ mL}$, при што е добиена стандардна девијација од $0,03 \text{ mL}$. Оваа вредност директно се користи во конечната пресметка, односно $u(V_{rep}) = 0,03 \text{ mL}$.

Конечно, треба да се земе предвид и температурниот ефект, бидејќи волуметриската колба е калибрирана на $20 \text{ }^\circ\text{C}$, додека лабораториската температура варира помеѓу $16 \text{ }^\circ\text{C}$ и $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$). Неодреденоста од овој ефект се пресметува

за целниот волумен (500,0 mL) врз основа на варијацијата на температурата и коефициентот на експанзија на волуменот, т.е. 0,00021 на 1 °C:

$$\text{Volume expansion} = 500,0 \text{ mL} \times 4 \text{ }^\circ\text{C} \times \frac{0,00021}{1^\circ\text{C}} = 0,420 \text{ mL}$$

Под претпоставка дека постои правоаголна дистрибуција, неодреденоста на варијацијата на температурата изнесува:

$$u(V_T) = \frac{0,420}{\sqrt{3}} = 0,2425 \text{ mL}$$

Комбинирањето на овие три извори на неодреденост овозможува пресметка на стандардната неодреденост на волуменот на разредување на основниот раствор, односно:

$$U(V_{stock}) = \sqrt{(0,05)^2 + (0,03)^2 + (0,2425)^2} = 0,249 \text{ mL}$$

Релативната стандардна неодреденост на волуменот на разредување на стандардниот раствор, пак, изнесува:

$$\frac{u(V_{st})}{(V_{st})} = \frac{0,249 \text{ mL}}{500,0 \text{ mL}} = 0,0005$$

Со цел да се обезбеди точна проценка, неопходно е да се искомбинираат релативните придонеси од мерењето на масата на TRH и волуменот за разредување. Резимето на поединечните вредности е прикажано во Табела 8.

Табела 8. Резиме на вредностите на неодреденост при подготовката на основниот раствор (EDQM, 2020c)

Опис	Вредност (X)	U(X)	$\frac{U(X)}{X}$
Маса на TRH	19,5 mg	0,3654 mg	0,0187
Волумен за разредување	500,0 mL	0,249 mL	0,0005

Врз основа на податоците од Табела 8., релативните придонеси се комбинираат за да се пресмета стандардната неодреденост при подготовката на основниот раствор:

$$\frac{u(C_{stock})}{C_{stock}} = \sqrt{(0,0187)^2 + (0,0005)^2} = 0,0187$$

Понатаму, се пресметува концентрацијата на основниот раствор:

$$C_{stock} = \frac{19,5 \text{ mg} \times 0,97}{500,0 \text{ mL}} = 0,038 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 0,038 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Оттука, неодреденоста на концентрацијата на основниот раствор се добива како:

$$u(C_{stock}) = 0,038 \times 0,0187 = 0,0007 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Четвртиот извор на неодреденост се однесува на конверзијата на концентрацијата на TRH од g/L во mol/L. За да се изврши оваа конверзија, неопходно е да се земе предвид моларната маса на соединението, која се пресметува врз основа на стандардните атомски маси на неговите елементи. Во Табела 9. се прикажани стандардните атомски маси и нивните соодветни неодредености за атомите во молекулата на TRH (C₁₆H₂₂N₆O₄).

Табела 9. Стандардни атомски маси и неодредености на составните елементи на TRH (EDQM, 2020c)

Елемент	Стандардна атомска маса	Квотирана неодреденост [u(E)]	Стандардна неодреденост [$\frac{u(E)}{\sqrt{3}}$]
Јаглерод (C)	12,0106	± 0,001	0,0006
Кислород (O)	15,9994	± 0,00037	0,00021
Водород (H)	1,007975	± 0,000135	0,000078
Азот (N)	14,00674	± 0,00042	0,000245

Моларната маса на TRH се пресметува како:

$$M_{TRH} = 16 \times 12,0106 + 22 \times 1,007975 + 6 \times 14,00674 + 4 \times 15,9994 = 362,38309 \frac{g}{mol}$$

Стандардната неодреденост на моларната маса се добива со пропација на неодреденостите на атомските маси:

$$u(M_{TRH}) = \sqrt{16 \times (0,0006)^2 + 22 \times (0,000078)^2 + 6 \times (0,000245)^2 + 4 \times (0,00021)^2} \\ = 0,02536 \frac{g}{mol}$$

Релативната стандардна неодреденост на моларната маса изнесува:

$$\frac{u(M_{TRH})}{M_{TRH}} = \frac{0,02536 \frac{g}{mol}}{362,38309 \frac{g}{mol}} = 0,000007$$

Концентрацијата на TRH, првично изразена во g/L, се конвертира во mol/L со употреба на моларната маса, користејќи ја следнава равенка:

$$C_{TRH} \left[\frac{mol}{L} \right] = \frac{C_{TRH} \left[\frac{g}{L} \right]}{M_{TRH}} \quad [15]$$

Со замена на вредностите во Равенката 15 се добива:

$$C_{TRH} = \frac{0,038 \frac{g}{L}}{362,38309 \frac{g}{mol}} = 0,000105 \frac{mol}{L} = 0,105 \frac{mmol}{L}$$

Со цел да се обезбеди точна проценка, неопходно е да се искombинираат релативните придонеси од концентрацијата и моларната маса на TRH. Резимето на поединечните вредности е прикажано во Табела 10.

Табела 10. Резиме на вредностите на неодреденост при конверзија на концентрацијата на TRH (EDQM, 2020c)

Опис	Вредност (X)	U(X)	$\frac{U(X)}{X}$
Концентрација на TRH	0,038 g/L	0,0007 g/L	0,0184
Моларна маса на TRH	362,3839 g/mol	0,00189 g/mol	0,000005

Врз основа на податоците од Табела 10., релативните придонеси се комбинираат за да се пресмета стандардната неодреденост при конверзија на концентрацијата на TRH:

$$\frac{u(C_{TRH})}{C_{TRH}} = \sqrt{(0,0184)^2 + (0,000005)^2} = 0,0184$$

Конечно, неодреденоста на концентрацијата на TRH во основниот раствор (mmol/L) изнесува:

$$u(C_{TRH}) = C_{TRH} \times 0,0184 = 0,105 \times 0,0184 = 0,001932 \frac{mmol}{L}$$

Компонента 2: Подготовка на конечниот раствор на TRH

Кога станува збор за втората компонента, прв извор на неодреденост претставува волуменот на разредување на примерокот. Овој извор вклучува три дополнителни фактори: калибрација на волуменот, повторливост на мерењата и температурен ефект.

Според сертификатот на производителот, неодреденоста на мерењето за пипетата од 10,0 mL изнесува $\pm 0,04$ mL, додека за волуметриската колба од 100,0 mL изнесува $\pm 0,1$ mL, при температура од 20 °C. Бидејќи не е наведено нивото на доверба, ниту, пак, распределбата, се претпоставува триаголна распределба, при што е поверојатно вистинската вредност да се наоѓа во центарот отколку на крајните граници. Врз основа на оваа претпоставка, стандардните неодредености на калибрацијата на волуменот се пресметуваат на следниов начин:

$$u(V_{PipetteCal}) = \frac{0,04}{\sqrt{6}} = 0,0163 \text{ mL}$$

$$u(V_{FlaskCal}) = \frac{0,1}{\sqrt{6}} = 0,0408 \text{ mL}$$

Повторливоста на мерењата претставува уште еден значаен извор на неодреденост. При изведување на две серии од по десет мерења со методот на полнење и мерење на масата, добиени се соодветни стандардни девијации, односно: $u(V_{PipetteRep}) = 0,012$ и $u(V_{FlaskRep}) = 0,010$. Овие вредности, поради нивната директна врска со стабилноста на мерењата, се земаат како стандардни неодредености.

Се зема предвид и влијанието на температурата. Имено, пипетата и волуметриската колба се калибрирани на 20 °C, а температурата на лабораторијата варира меѓу 16 °C и 24 °C (20 °C ± 4 °C). Неодреденоста од овој ефект се пресметува за целниот волумен на двата лабораториски сада (10,0 и 100,0 mL), врз основа на варијацијата на температурата и коефициентот на експанзија на волуменот, т.е. 0,00021 на 1 °C:

$$Volumeexpansion(Pipette) = 10,0 \text{ mL} \times 4 \text{ }^\circ\text{C} \times \frac{0,00021}{1^\circ\text{C}} = 0,0084 \text{ mL}$$

$$Volumeexpansion(Flask) = 100,0 \text{ mL} \times 4 \text{ }^\circ\text{C} \times \frac{0,00021}{1^\circ\text{C}} = 0,084 \text{ mL}$$

Претпоставувајќи правоаголна распределба, неодреденоста на варијацијата на температурата за двата лабораториски сада изнесува:

$$u(V_{PipetteT}) = \frac{0,0084}{\sqrt{3}} = 0,00485 \text{ mL}$$

$$u(V_{FlaskT}) = \frac{0,084}{\sqrt{3}} = 0,0485 \text{ mL}$$

Комбинирањето на поединечните извори на неодреденост (калибрација, повторливост и температурен ефект) резултира со вкупна стандардна неодреденост на волуменот на разредување на примерокот. Таа се пресметува според следниве равенки:

$$u(V_{Pipette}) = \sqrt{(0,0163)^2 + (0,012)^2 + (0,00485)^2} = 0,02081 \text{ mL}$$

$$u(V_{Flask}) = \sqrt{(0,0408)^2 + (0,010)^2 + (0,0485)^2} = 0,06416 \text{ mL}$$

Релативните стандардни неодредености изнесуваат:

$$\frac{u(V_{Pipette})}{V_{Pipette}} = \frac{0,02081 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0,002081$$

$$\frac{u(V_{Flask})}{V_{Flask}} = \frac{0,06416 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0,0006416$$

Чекор 4: Пресметка на комбинираната стандардна и проширената неодреденост

Комбинираната стандардна неодреденост се добива со вклучување на релативните придонеси од концентрацијата на основниот раствор, волуменот на пипетата и волуменот на волуметриската колба, односно:

$$\frac{u_c}{C_{TRHfinal}} = \sqrt{(0,0184)^2 + (0,002081)^2 + (0,0006416)^2} = 0,0185$$

Оттука следува дека комбинираната стандардна неодреденост изнесува:

$$u_c = 0,0185 \times 0,0105 = 0,000195 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

Придонесот на моларната маса на TRH во вкупната неодреденост е занемарлив и затоа може да се исклучи од пресметката.

Проширената неодреденост, при фактор на покриеност $k = 2$, што соодветствува приближно на 95% ниво на доверба, изнесува:

$$U = 2 \times 0,000195 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} = 0,0004 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

На крај, конечниот резултат за концентрацијата на TRH, изразен со проширена неодреденост, изнесува **0,0105 mmol/L ± 0,0004 mmol/L**, со ниво на доверба од 95% ($k = 2$).

III. Проценка на комбинираната неодреденост со користење табеларен пристап

Неодреденоста на конечната концентрација на растворот на TRH може да се процени и преку т.н. табеларен пристап (Табела 11. и Табела 12.). Овој пристап овозможува систематско сумирање на врската помеѓу сите варијабли кои имаат влијание врз неодреденоста на концентрацијата на TRH (изразена преку Равенка 14).

За пресметка на комбинираната стандардна неодреденост се користи следново равенство:

$$u_c = \sqrt{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta Mass} \right)^2 \times u^2(Mass) + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta Purity} \right)^2 \times u^2(Purity) + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right)^2 \times u^2(M) + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500mL}} \right)^2 \times u^2(V_{500mL}) + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100mL}} \right)^2 \times u^2(V_{100mL}) + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10mL}} \right)^2 \times u^2(V_{10mL}) \right]} \quad [16]$$

каде парцијалната изведба $\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta x_i} \right)$, позната и како коефициент на чувствителност, претставува мерка за чувствителноста на концентрацијата на TRH на промени во соодветната влезна варијабла. Вреди да се нагласи дека Равенка 16 не ја зема предвид можната корелација помеѓу измерените вредности. Сепак, табеларниот пристап претставува едноставен и практичен метод за проценка на комбинираната неодреденост, овозможувајќи транспарентен преглед на сите придонеси и нивната релативна важност.

Табела 11. Компоненти вклучени во проценката на комбинираната неодреденост со табеларен пристап (EDQM, 2020c)

Нумеричка диференцијација преку промена на дијагоналните елементи со апсолутните стандардни девијации						
Количина	$u(m)$	$u(P)$	$u(M)$	$u(V_{500})$	$u(V_{100})$	$u(V_{10})$
<i>m</i>	$m + u(m)$	m	m	m	m	m
<i>P</i>	P	$P + u(P)$	P	P	P	P
<i>M</i>	M	M	$M + u(M)$	M	M	M
<i>V</i>_{500 mL}	$V_{500 mL}$	$V_{500 mL}$	$V_{500 mL}$	$V_{500 mL} + u(V_{500})$	$V_{500 mL}$	$V_{500 mL}$
<i>V</i>_{100 mL}	$V_{100 mL}$	$V_{100 mL}$	$V_{100 mL}$	$V_{100 mL}$	$V_{100 mL} + u(V_{100})$	$V_{100 mL}$
<i>V</i>_{10 mL}	$V_{10 mL}$	$V_{10 mL}$	$V_{10 mL}$	$V_{10 mL}$	$V_{10 mL}$	$V_{10 mL} + u(V_{10})$
Резултат	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta m} \right) \times u(m)}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta m} \right) \times u(m)}$	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta P} \right) \times u(P)}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta P} \right) \times u(P)}$	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right) \times u(M)}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right) \times u(M)}$	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500}} \right) \times u(V_{500})}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500}} \right) \times u(V_{500})}$	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100}} \right) \times u(V_{100})}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100}} \right) \times u(V_{100})}$	$\frac{\Delta C_{TRH} + \left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10}} \right) \times u(V_{10})}{\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10}} \right) \times u(V_{10})}$
ΔC_{TRH}	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta m} \right) \times u(m)$	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta P} \right) \times u(P)$	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right) \times u(M)$	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500}} \right) \times u(V_{500})$	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100}} \right) \times u(V_{100})$	$\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10}} \right) \times u(V_{10})$
$(\Delta C_{TRH})^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta m} \right) \times u(m) \right]^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta P} \right) \times u(P) \right]^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right) \times u(M) \right]^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500}} \right) \times u(V_{500}) \right]^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100}} \right) \times u(V_{100}) \right]^2$	$\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10}} \right) \times u(V_{10}) \right]^2$
Индекс	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta m} \right) \times u(m) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta P} \right) \times u(P) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta M} \right) \times u(M) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{500}} \right) \times u(V_{500}) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{100}} \right) \times u(V_{100}) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$	$\frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta V_{10}} \right) \times u(V_{10}) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$
$u(C_{TRH}) = \sqrt{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$						
Формула за релативниот придонес (Индекс) на секоја поединечна компонента кон комбинираната неодреденост: $Index_i = \frac{\left[\left(\frac{\delta C_{TRH}}{\delta x_i} \right) \times u(x_i) \right]^2}{\Sigma(\Delta C_{TRH})^2}$						

m: маса; *P*: чистота; *M*: моларна маса

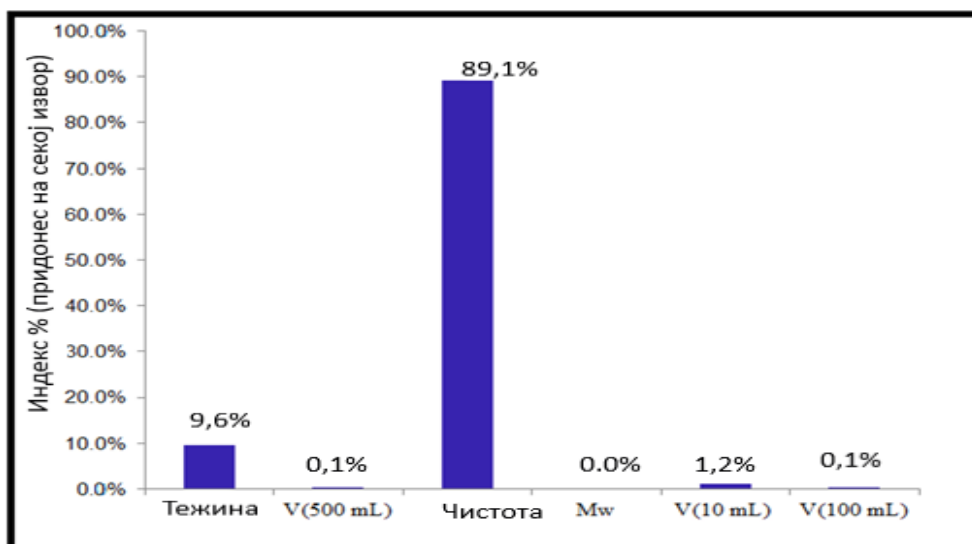
Табела 12. Проценка на комбинираната неодреденост при пресметка на концентрацијата на TRH со табеларен пристап (EDQM, 2020с)

Количество	Вредност		$u(X)$	Единица		
<i>Маса</i>	19,5		0,1140	mg		
V_{500}	500		0,2492	mL		
<i>Чистота</i>	0,97		0,0173			
<i>М</i>	362,384		0,0019	g/mol		
V_{10}	10		0,0208	mL		
V_{100}	100		0,0642	mL		
$C = \frac{(\text{маса} \times \text{чистота} \times 10)}{(M_w \times 500 \times 100)} = \frac{19,5 \times 0,97 \times 10}{362,384 \times 500 \times 100} = 0,014 \text{ mM}$						
$u(X)$	0,114039293	0,2491987	0,01732051	0,001892	0,02083715	0,0641768
Количество	<i>Маса</i>	V_{500}	<i>Чистота</i>	<i>М</i>	V_{10}	V_{100}
<i>Маса</i>	19,614	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
V_{500}	500	500,249	500	500	500	500
<i>Чистота</i>	0,97	0,97	0,987	0,97	0,97	0,97
<i>М</i>	362,384	362,384	362,384	362,386	362,384	362,384
V_{10}	10	10	10	10	10,0208	10
V_{100}	100	100	100	100	100	100,064
C_{TRH}	0,010439205	mg/L				
C_{TRH}	0,01050	0,01043	0,01063	0,01044	0,01046	0,01043
$c_i \times u(x_i)$	0,0000611	-0,0000052	0,0001864	0,000000	0,0000218	-0,0000067
$[c_i \times u(x_i)]^2$	3,72713E-09	2,704E-11	3,4747E-08	2,97E-15	4,7316E-10	4,483E-11
Indexes	9,6%	0,1%	89,1%	0,0%	1,2%	0,1%
$\sum [c_i \times u(x_i)]^2$	3,90188E-08					
$u(C_{TRH})$	0,000198	$u_c(C_{TRH}) = \sqrt{\sum (c_i \times u(x_i))^2}$				
$U_{\text{Проширена}}$	0,000395	$k = 2$				

Врз основа на табеларниот пристап пресметаната комбинирана неодреденост изнесува 0,0002 mmol/L. Со примена на фактор на покриеност $k = 2$, кој соодветствува приближно на 95% ниво на доверба, добиената проширена неодреденост изнесува 0,0004 mmol/L. Согласно тоа, конечниот резултат за концентрацијата на TRH може да се изрази како:

$$C_{TRH} = 0,0108 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \pm 0,0004 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \quad (k = 2, \sim 95\% \text{ ниво на доверба})$$

Придонесот на секој извор на неодреденост кон комбинираната неодреденост е прикажан на Слика 14. Како што може да се забележи, чистотата на TRH претставува доминантен извор на неодреденост.



Слика 14. Придонес на поединечните извори на неодреденост кон комбинираната неодреденост (EDQM, 2020c)

3.7. Проценка на мерната неодреденост со примена на пристапот од горе надолу (Tow-down approach)

Според Европската фармакопеја (Ph. Eur. 5.12), сертифициран референтен материјал (Certified Reference Material, CRM) претставува референтен материјал кој е карактеризиран со метролошки валидна постапка за едно или повеќе специфицирани својства. Тој секогаш е придружен со сертификат во кој е наведена вредноста на специфицираното својство, неговата неодреденост, како и изјава за метролошка следливост (EDQM, 2020d). Сертифицираните референтни материјали се достапни како чисти супстанции, раствори во чист растворувач или како супстанции во матрикс. Тие најчесто се користат за квалификација и калибрација на опрема, за валидација и контрола на квалитет на аналитички постапки, особено за евалуација на прецизноста и систематските грешки (т.е. неодреденоста) на методот.

Неодреденоста на CRM може да се изрази како:

- Проширена неодреденост (во единици на резултатот од испитувањето)

На пример, пуферски раствор кој се користи за калибрација на pH метри има сертифицирана вредност од $7,00 \pm 0,02$ pH единици (проширената неодреденост дадена во сертификатот е $U(pH) = 0,02$, за фактор на покриеност $k = 2$).

Стандардната неодреденост, $u(pH)$, односно стандардната девијација (во единици на резултатот од испитувањето), може да се пресмета од проширената неодреденост како:

$$u(pH) = \frac{0,02}{2} = 0,01 \text{ pH единици}$$

Понатаму релативната стандардна неодреденост се пресметува како:

$$\frac{u(pH)}{pH \text{ (сертифицирана вредност)}} = \frac{0,01}{7,00} = 0,0014$$

Оттука може да се заклучи дека добиената вредност за релативната стандардна неодреденост одговара на 0,14%.

- Проширена неодреденост (како релативна вредност во проценти, односно %RSD од средната вредност на мерењата, во случаи кога изворите на варијација имаат различни единици)

I. Пример бр. 1:

Во сертификатот за анализа на референтниот материјал рафоксанид, наведено е дека декларираната содржина (C_{cert}) на овој сертифициран референтен материјал изнесува 99,7%. Исто така, во сертификатот е посочено дека проценетата неодреденост на резултатот од едно мерење на содржината може да се очекува да изнесува 0,5%

релативно (ниво на доверба $P = 95 \%$, $n = 6$). Притоа, наведено е дека содржината се пресметува како 100% минус детектираните онечистувања. Бидејќи сертификатот го содржи бројот на извршени определувања (n), факторот на покриеност ($k = 2$) може да се замени со Студентовата t -вредност, земајќи го предвид нивото на доверба и бројот на повторувања наведени во сертификатот. Оттаму, за $P = 95 \%$ и $n = 6$, Студентовата t -вредност изнесува 2,571. Вредноста од 0,5% наведена во сертификатот претставува релативна проширена неодреденост ($U(C_{CertRel})$). Стандардната неодреденост ($u(C_{Cert})$) може да се пресмета на следниов начин:

а) како проширена неодреденост (изразена во единици на резултатот од испитувањето), која се пресметува на следниов начин:

$$U(C_{Cert}) = \frac{U(C_{CertRel})}{100} \times C_{Cert} \quad [17]$$

Со замена на вредностите во Равенка 17 се добива:

$$U(C_{Cert}) = \frac{0,5}{100} \times 0,997 = 0,004985\%$$

б) како стандардна неодреденост (изразена во единици на резултатот од испитувањето), која се пресметува на следниов начин:

$$u(C_{Cert}) = \frac{U(C_{Cert})}{t\text{-value}} \quad [18]$$

Со замена на вредностите во Равенка 18 се добива:

$$U(C_{Cert}) = \frac{0,004985}{2,571} = 0,001939\%$$

II. Пример бр. 2:

Во сертификатот за анализа на раствор на перхлорна во оцетна киселина, со концентрација од $0,1 \text{ mol/L}$, е наведена декларирана концентрација: $C_{Cert} = 0,1003 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \pm 0,2 \%$. Бидејќи во сертификатот не е наведен бројот на изведени мерења (n), проширената неодреденост се пресметува со примена на фактор на покриеност $k = 2$, на ниво на доверба $P = 95 \%$.

Со замена на вредностите во Равенка 17 се добива:

$$U(C_{Cert}) = \frac{0,2}{100} \times 0,1003 = 0,0002 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Стандардната неодреденост, за фактор на покриеност $k = 2$ и ниво на доверба $P = 95 \%$, изнесува:

$$u(C_{Cert}) = \frac{0,0002}{2} = 0,0001 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Конечно, релативната стандардна неодреденост изнесува:

$$\frac{u(C_{Cert})}{C_{Cert}} = \frac{0,0001}{0,1003} = 0,001$$

Оттука, може да се заклучи дека добиената вредност за релативната стандардна неодреденост одговара на $0,1\%$.

3.7.1. Проценка на мерната неодреденост со пристапот од горе надолу (Top-down) преку определување на параметарот точност при валидација на аналитички метод за определување на карпрофен

I. Опис на аналитичката постапка

Содржината на карпрофен во таблети се определува со претходно валидиран, интерно развиен HPLC метод. Конкретно, содржината се определува преку две независни анализи на прашок добиен со спрашување на пет таблети карпрофен.

II. Проценка на мерната неодреденост

Чекор 1: Спецификација на мерната величина

Мерната величина е содржината на карпрофен во таблети, изразена во mg/таблета .

Чекор 2: Квантификација на мерната неодреденост со користење податоци од сертифициран референтен материјал

За време на валидацијата на методот, аналитичкиот принос (recovery) беше определен со употреба на сертифициран референтен материјал карпрофен. Притоа, во сертификатот за анализа се наведени информации за чистотата $C_{Cert} = 99,7\%$, со проширена неодреденост $U = \pm 0,2\%$ и фактор на покриеност $k = 2$. Имајќи ги предвид овие информации, направени се следниве пресметки:

- Стандардна неодреденост (во единици на резултатот од испитувањето):

$$u(C_{Cert}) = \frac{0,2}{2} = 0,1\%$$

- Релативна стандардна неодреденост:

$$\frac{u(C_{Cert})}{C_{Cert}} = \frac{0,1}{99,7} = 0,001$$

Оттука, може да се заклучи дека добиената вредност за релативната стандардна неодреденост одговара на 0,1%.

При испитување на параметарот точност, аналитичкиот принос беше определен преку спајување на примероци со карпрофен на три концентрациски нивоа (80%, 100% и 120% од номиналната содржина, што соодветствува на 24,20, 30,25 и 36,30 mg/g карпрофен). За таа цел во плацебо се додаваат соодветни волумени раствор подготвен со сертифициран референтен материјал на карпрофен. Точноста, изразена како аналитички принос (R), се пресметува како однос помеѓу добиената вредност (C_{obs}) и номиналната вредност (C_{nom}), а резултатите се прикажани во Табела 13.

Табела 13. Резултати од експериментите за аналитички принос (recovery) на карпрофен (EDQM, 2020d)

Конц. ниво (%)	C_{nom}	C_{obs}	Принос, R (%)	Бр. на мерења	Средна вредност од R (%)	S (%)
80	24,20	23,75	98,14	3	98,18	0,559
	24,20	23,63	97,64			
	24,20	23,90	98,76			
100	30,25	30,12	99,57	3	99,01	0,618
	30,25	29,98	99,11			
	30,25	29,75	98,35			
120	36,30	35,65	98,21	3	98,89	0,689
	36,30	35,89	98,87			
	36,30	36,15	99,59			
			Збирно	9	98,69	0,624

Средната вредност од деветте определувања на аналитичкиот принос (\bar{R}) беше пресметана користејќи ја следнава равенка:

$$\bar{R} = \frac{(N_{80\%} \times \bar{R}_{80\%}) + (N_{100\%} \times \bar{R}_{100\%}) + (N_{120\%} \times \bar{R}_{120\%})}{N_{80\%} + N_{100\%} + N_{120\%}} \quad [19]$$

Со замена на вредностите во Равенка 19 се добива:

$$\bar{R} = \frac{(3 \times 98,18) + (3 \times 99,01) + (3 \times 98,89)}{3 + 3 + 3} = 98,69\%$$

Вкупната стандардна девијација (S) се пресметува со следнава равенка:

$$S = \sqrt{\frac{(N_{80\%}-1) \times S_{80\%}^2 + (N_{100\%}-1) \times S_{100\%}^2 + (N_{120\%}-1) \times S_{120\%}^2}{(N_{80\%}-1) + (N_{100\%}-1) + (N_{120\%}-1)}} \quad [20]$$

Со замена на вредностите во Равенка 20 се добива:

$$S = \sqrt{\frac{(3-1) \times (0,559)^2 + (3-1) \times (0,618)^2 + (3-1) \times (0,689)^2}{(3-1) + (3-1) + (3-1)}} = 0,624\%$$

Соодветната %RSD изнесува:

$$RSD = \frac{0,624}{98,69} \times 100 = 0,632 \%$$

Горенаведените равенки се користат за пресметка на просечен аналитички принос и просечна стандардна девијација на различните нивоа на спајкување. Тие може да се применат само доколку просечните вредности на аналитичкиот принос, од една страна, и стандардните девијации, од друга страна, се доволно блиски. Во спротивно неодреденоста треба да се пресмета посебно за секое ниво на спајкување.

Стандардната неодреденост на просечниот аналитички принос, $u(\bar{R})$, изнесува:

$$u(\bar{R}) = \frac{0,624}{\sqrt{9}} = 0,208 \%$$

Релативната стандардна неодреденост на просечниот аналитички принос, $\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}}$, изнесува:

$$\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}} = \frac{0,208}{98,69} = 0,00211$$

Оттука може да се заклучи дека добиената вредност за релативната стандардна неодреденост одговара на 0,211%.

Релативната комбинирана стандардна неодреденост на просечниот аналитички принос ($\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}}$) се пресметува со комбинирање на релативната стандардна неодреденост на просечниот аналитички принос ($\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}}$) и релативната стандардна неодреденост на CRM ($\frac{u(C_{Cert})}{C_{Cert}}$), наведена во сертификатот, користејќи ја следнава равенка:

$$\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}} = \sqrt{\left(\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{Cert})}{C_{Cert}}\right)^2} \quad [21]$$

Со замена на вредностите во Равенка 21 се добива:

$$\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}} = \sqrt{(0,00211)^2 + (0,001)^2} = 0,00233$$

Оттука може да се заклучи дека добиената вредност за релативната комбинирана стандардна неодреденост одговара на 0,233%.

Неодреденоста поврзана со подготовката на растворите за спајкување не е земена предвид во оваа пресметка, бидејќи најчесто се смета за занемарлива.

Отстапувањето (bias) претставува разлика помеѓу добиената средна вредност и номиналната вредност. Истото може да се изрази како апсолутна или релативна (%) разлика. Важно е да се утврди дали проценетото отстапување е статистички значајно или не, со цел да се евалуира потребата од потенцијална корекција на конечниот резултат. Значајноста на отстапувањето се оценува преку споредба на пресметаната t -вредност според Студентовиот тест (t_{calc}) со критичната t -вредност (NIST/SEMATECH, 2012). Пресметката на t_{calc} се врши според равенката:

$$t_{calc} = \frac{\bar{R} - E}{\sqrt{u_c(\bar{R})^2 + u(C_{Cert})^2}} \quad [22]$$

Во случај кога поединечните аналитички приноси се изразени како процент од очекуваното концентрациско ниво, очекувана вредност, E , ќе биде еднаква на 1, односно 100%.

Во примерот со CRM за карпрофен:

$$t_{calc} = \frac{0,9869 - 1}{\sqrt{0,00208^2 + 0,001^2}} = -5,69$$

Знакот на пресметаната t -вредност укажува на негативно отстапување, што во конкретниот случај значи дека измерената содржина на таблетата, во просек, е пониска од вистинската содржина. Имајќи ги предвид збирот од бројот на степени на слобода (кој изнесува 6, бидејќи 2 степени на слобода се множат со 3 концентрациски нивоа) и нивото на доверба $P = 95 \%$, утврдено е дека критичната t -вредност изнесува 2,45. Оттука, може да се заклучи дека отстапувањето е статистички значајно, бидејќи

пресметаната t -вредност, според нејзината апсолутна вредност (5,69), е поголема од критичната t -вредност (2,45).

Во проценката на значајноста на отстапувањето може да се разгледаат три потенцијални сценарија од добиените резултати и начинот на нивното толкување: значајно отстапување со корекција, значајно отстапување без корекција и незначајно отстапување.

Случај 1: Значајно отстапување со корекција

Доколку отстапувањето е значајно, конечниот резултат од определувањето на содржината може да се коригира така што средната вредност на резултатите од определувањето ќе се подели со просечниот аналитички принос (изразен како процент поделен со 100).

На пример, резултатот од определувањето на содржината на карпрофен во таблети изнесува 48,60 mg/таблета ($RSD = 0,98\%$). Овој резултат е добиен како средна вредност од две определувања направени на примерок добиен со спрашување на пет таблети. Коригираната средна вредност се пресметува на следниов начин:

$$\text{Коригирана средна вредност} = \frac{48,60}{0,9869} = 49,25 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Релативната комбинирана стандардна неодреденост на коригираната средна вредност се пресметува со комбинирање на релативната комбинирана стандардна неодреденост на просечниот аналитички принос ($\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}}$) и RSD^2 поделена со бројот на определувања на содржината (n), односно:

$$\frac{u_c(\text{Коригирана средна вредност})}{\text{Коригирана средна вредност}} = \sqrt{\frac{RSD^2}{n} + \left(\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}}\right)^2} \quad [23]$$

Со замена на вредностите во Равенка 23 се добива:

$$\frac{u_c(\text{Коригирана средна вредност})}{\text{Коригирана средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0098^2}{2} + 0,00233^2} = 0,00767$$

Алтернативно, релативната комбинирана стандардна неодреденост може да се пресмета со користење на варијабилноста добиена од експериментите со спајкување, наместо варијабилноста пресметана при определувањето на содржината:

$$\frac{u_c(\text{Коригирана средна вредност})}{\text{Коригирана средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0632^2}{9} + 0,00233^2} = 0,00314$$

На крај, проширената неодреденост (за фактор на покриеност $k = 2$ и ниво на доверба од 95%) се пресметува според равенката:

$$U = k \times \frac{u_c(\text{Коригирана средна вредност})}{\text{Коригирана средна вредност}} \times \text{Коригирана средна вредност} \quad [24]$$

Кога се земаат предвид двете определувања на содржината, со замена на вредностите во Равенка 24, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,00767 \times 48,60 = 0,75 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Кога се земаат предвид експериментите со спајкување, со замена на вредностите во Равенка 24, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,00314 \times 48,60 = 0,31 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Случај 2: Значајно отстапување без корекција

Доколку отстапувањето е значајно, но не се применува корекција на резултатот од определувањето на содржината, релативната комбинирана стандардна неодреденост се пресметува според следново равенство:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{RSD^2}{n} + \left(\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}}\right)^2 + bias^2} \quad [25]$$

каде што n е бројот на определувања на содржината.

Кога се земаат предвид двете определувања на содржината, со замена на вредностите во Равенка 25, за релативната комбинирана стандардна неодреденост се добива:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0098^2}{2} + 0,00233^2 + (1 - 0,9869)^2} = 0,0150$$

Кога се земаат предвид експериментите со спајкување, со замена на вредностите во Равенка 25, за релативната комбинирана стандардна неодреденост се добива:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0632^2}{9} + 0,00233^2 + (1 - 0,9869)^2} = 0,0135$$

На крај, проширената неодреденост (за фактор на покриеност $k = 2$ и ниво на доверба од 95%) се пресметува според равенката:

$$U = k \times \frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} \times \text{Средна вредност} \quad [26]$$

Кога се земаат предвид двете определувања на содржината, со замена на вредностите во Равенка 26, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,0150 \times 48,60 = 1,46 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Кога се земаат предвид експериментите со спајкување, со замена на вредностите во Равенка 26, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,0135 \times 48,60 = 1,31 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Случај 3: Незначајно отстапување

Доколку при изведба на експериментите со спајкување е добиен просечен аналитички принос од 99,95% ($n = 9$) со стандардна девијација $S = 0,253$ %, комбинираната неодреденост на просечниот аналитички принос се пресметува во два чекора.

Во првиот чекор стандардната неодреденост на просечниот аналитички принос ($u(\bar{R})$) се пресметува на следниов начин:

$$u(\bar{R}) = \frac{0,253}{\sqrt{9}} = 0,0843 \%$$

Потоа, за релативната стандардна неодреденост на просечниот аналитички принос ($\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}}$) се добива:

$$\frac{u(\bar{R})}{\bar{R}} = \frac{0,0843}{99,95} = 0,000843$$

Со замена на вредностите во Равенка 21, релативната комбинирана стандардна неодреденост изнесува:

$$\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}} = \sqrt{0,000843^2 + 0,001^2} = 0,00131$$

Во вториот чекор значајноста на отстапувањето се оценува со примена на Студентовиот тест. За таа цел, со замена на вредностите во Равенка 22, најпрво се утврдува t_{calc} :

$$t_{calc} = \frac{0,9995 - 1}{\sqrt{0,000843^2 + 0,001^2}} = -0,381$$

Знакот на пресметаната t -вредност укажува на негативно отстапување, што во конкретниот случај повторно значи дека измерената содржина на таблетата, во просек, е пониска од вистинската содржина. Сепак, ова отстапување не е статистички значајно, бидејќи апсолутна вредност на t_{calc} е помала од критичната вредност (2,45), која е пресметана за 6 степени на слобода (2 степени на слобода се множат со 3 концентрациски нивоа) и ниво на доверба $P = 95$ %.

Иако во овој случај не е потребна корекција, сепак неодреденоста на просечното отстапување мора да биде вклучена во комбинираната неодреденост. Така, релативната комбинирана стандардна неодреденост на средната вредност се пресметува на следниов начин:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{RSD^2}{n} + \left(\frac{u_c(\bar{R})}{\bar{R}}\right)^2} \quad [27]$$

каде што n е бројот на определувања на содржината.

Кога се земаат предвид двете определувања на содржината, со замена на вредностите во Равенка 27, за релативната комбинирана стандардна неодреденост се добива:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0098^2}{2} + 0,00131^2} = 0,00705$$

Кога се земаат предвид експериментите со спајкување, со замена на вредностите во Равенка 27, за релативната комбинирана стандардна неодреденост се добива:

$$\frac{u_c(\text{Средна вредност})}{\text{Средна вредност}} = \sqrt{\frac{0,0632^2}{9} + 0,00131^2} = 0,0025$$

На крај, проширената неодреденост се пресметува за фактор на покриеност $k = 2$ и ниво на доверба од 95%.

Кога се земаат предвид двете определувања на содржината, со замена на вредностите во Равенка 26, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,00705 \times 48,60 = 0,69 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Кога се земаат предвид експериментите со спајкување, со замена на вредностите во Равенка 26, за проширената неодреденост се добива:

$$U = 2 \times 0,0025 \times 48,60 = 0,24 \frac{\text{mg}}{\text{таблета}}$$

Чекор 3: Известување (прикажување) на резултатите

Случај 1: Значајно отстапување со корекција

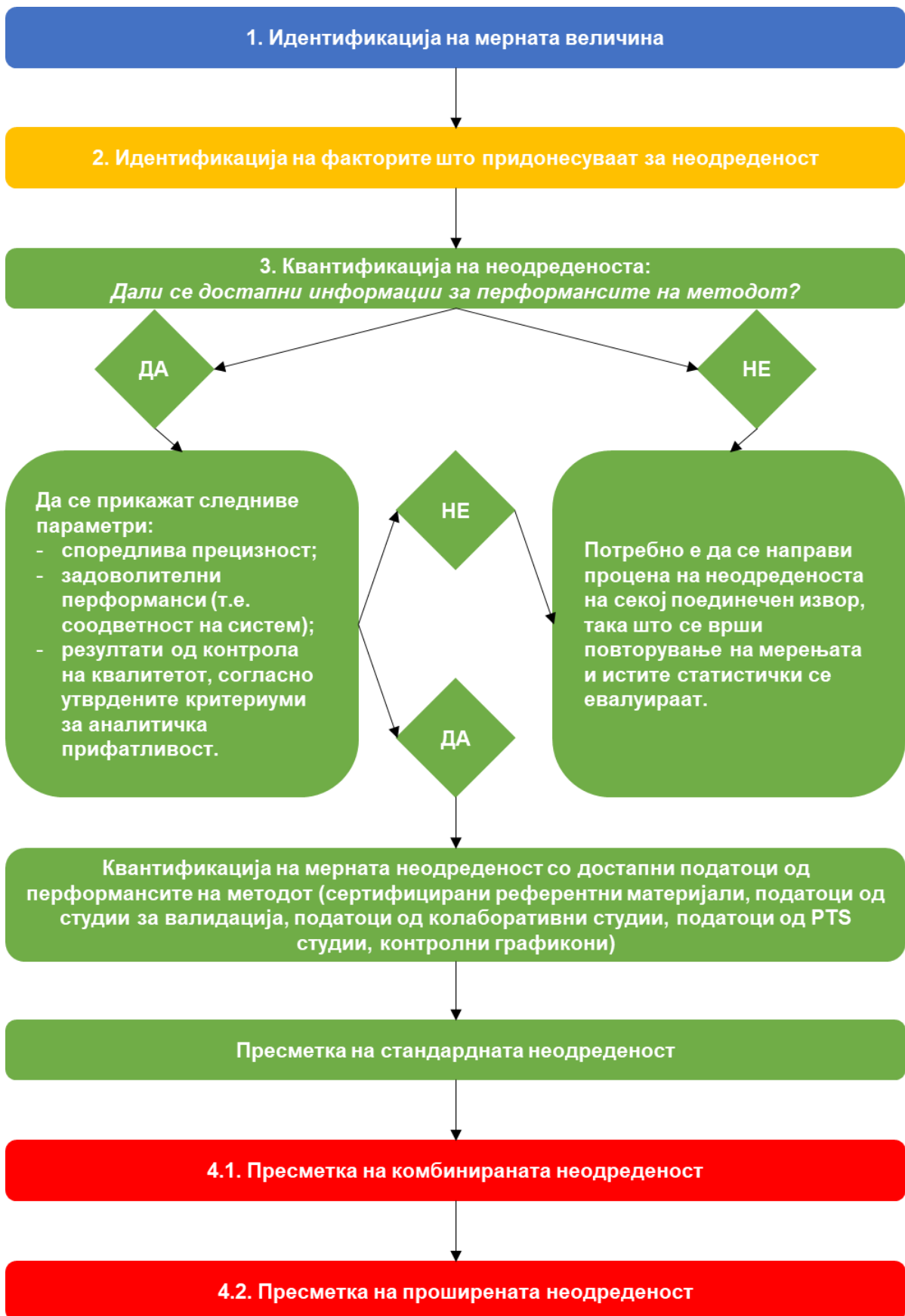
- $(49,25 \pm 0,75)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 2$, односно станува збор за две определувања на содржината;
- $(49,25 \pm 0,31)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 9$, односно станува збор за девет експерименти со спајкување.

Случај 2: Значајно отстапување без корекција

- $(48,60 \pm 1,46)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 2$, односно станува збор за две определувања на содржината;
- $(48,60 \pm 1,31)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 9$, односно станува збор за девет експерименти со спајкување.

Случај 3: Незначајно отстапување

- $(48,60 \pm 0,69)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 2$, односно станува збор за две определувања на содржината;
- $(48,60 \pm 0,24)$ mg/таблета, земајќи предвид дека $n = 9$, односно станува збор за девет експерименти со спајкување.



Слика 15. Општ пристап за евалуација на мерната неодреденост (автор)

4. ВОСПОСТАВУВАЊЕ СПЕЦИФИКАЦИИ

Добра дефиниција за тоа што претставува спецификација е дадена во водичите на Меѓународната конференција за хармонизација (ICH). Генерално, спецификацијата може да се дефинира како список тестови со упатување на аналитички процедури, при што за секој тест се утврдени соодветни критериуми за прифатливост, опсези или други параметри (ICH Q6A, 1999). Спецификацијата ги утврдува критериумите на кои мора да одговара активната супстанција, готовиот производ или материјалите во различни фази од производството за да се сметаат за соодветни за нивната целна употреба. Терминот „усогласеност со спецификацијата“ значи дека активната супстанција или готовиот производ, кога се испитуваат според наведените аналитички процедури, ги исполнуваат поставените критериуми за прифатливост (ICH Q6A, 1999). Спецификациите претставуваат критични стандарди за квалитет, кои се предлагаат и оправдуваат од страна на производителот, а потоа се одобруваат од регулаторните органи како услови за добивање одобрение.

Спецификациите претставуваат алатка за тестирање на сообразноста на материјалот со оние карактеристики кои гарантираат дека тој е погоден за неговата целна употреба. Таков материјал може да биде активна супстанција, почетен материјал за синтеза или меѓупроизвод, ексципиент или готова фармацевтска дозирана форма. Сепак, мора јасно да се нагласи дека квалитетот не може да се обезбеди исклучиво преку конечното тестирање и усогласеноста со спецификациите. Безбедноста и ефикасноста мора да бидат вградени во активната супстанција или готовиот производ преку: добро дизајниран и валидиран производствен процес, висококвалитетни производствени капацитети, оперативни процедури кои обезбедуваат придржување кон принципите на добрата производствена практика, соодветно обучен и компетентен персонал. Потребна е детална документација за да се гарантира почитување на добрите производствени принципи, а лабораториските услуги мора да бидат на највисоко ниво за да се потврди дека тестирањето на материјалот или производот дава сигурни, значајни и валидни податоци. Затоа усогласеноста со спецификациите и конечното тестирање се сметаат за последен чекор во еден многу поширок синџир активности што мора континуирано да се контролираат и следат.

Генерално, во процесот на истражување и развој на лековите се разликуваат три главни фази:

- *Генерирање потенцијални ентитети*, која ги опфаќа основните активности на откривање, односно создавање нова молекула на лекот и идентификација на нејзиниот фармаколошки потенцијал. Улогата на аналитичката хемија во оваа фаза е претежно насочена кон утврдување на квалитативната структура на молекулата и одредување на чистотата на мали серии од соединението. Во оваа фаза поставувањето формални спецификации има ограничено значење.
- *Оптимизација на потенцијални ентитети*, во која се спроведуваат студии за апсорпција, дистрибуција, метаболизам и екскреција на лекот. Дополнително се изведуваат фармаколошки истражувања со цел да се испита потенцијалниот терапевтски ефект и да се утврди токсиколошкиот профил на молекулата.
- *Реализација на производот*, која следи по утврдување на терапевтската активност на лекот и означува почеток на неговиот целосен развој. Оваа фаза вклучува подготовка за клинички испитувања и активности неопходни за пласирање на лекот на пазарот.

Во однос на поставувањето и градењето на спецификациите, најсоодветно е развојниот процес да се подели во следниве четири фази:

- I. Претклинички студии;
- II. Тестирање како подготовка за првата клиничка апликација за нов лек (клиничко испитување);
- III. Клинички испитувања од фаза II и фаза III;
- IV. Подготовка и поднесување на апликација за нов лек (барање за одобрение за ставање на лек во промет).

4.1. Воспоставување спецификации во различни фази од развојот на лековите

4.1.1. Претклинички студии

4.1.1.1. Претклинички студии: активна супстанција

Атрибутите за квалитет што ги карактеризираат лековите се применливи во сите фази од развојот. При изведување на почетните претклинички фармаколошки и токсиколошки тестови, активната супстанција мора да биде со соодветно дефиниран квалитет. Таа не треба да биде ниту премногу чиста ниту премногу контаминирана за да може да се направат точни фармаколошки проценки. Особено е важно токсиколошките својства на активната супстанција да се испитуваат со материјал добиен преку вообичаениот процес на синтеза, кој природно ги содржи типичните синтетски онечистувања што настануваат како нуспроизводи или остатоци од реагенси. Таквиот материјал потоа се формулира во соодветни дозирани форми (како, на пример, раствори, суспензии или храна за животни), со цел да се обезбеди реална проценка на безбедносниот профил. Дополнително, при подготовка на метаболити за метаболички и фармакокинетички студии, нивната чистота мора јасно да се дефинира за да се гарантира точноста и веродостојноста на добиените податоци.

Иако во оваа фаза не се утврдуваат формални спецификации, сепак се спроведува аналитичко тестирање и се проценува соодветноста на материјалите за нивната намена. Типичните тестови за испитување на активната супстанција во оваа фаза се прикажани во Табела 14. Најчесто поединечните онечистувања сè уште не се целосно идентификувани, а карактеризацијата на нивната структура останува на прелиминарно ниво. Карактеристиките како кристална состојба и полиморфизам, вообичаено, не се доволно разјаснети, а податоците за стабилноста се ограничени. И покрај тоа што во оваа фаза не се поставуваат формални спецификации, сепак се проценува соодветноста на активната супстанција за нејзината целна употреба во претклиничкото тестирање, врз основа на соодветна и научно издржана евалуација. Овие активности, вообичаено, ги изведува мултидисциплинарен тим, составен од аналитички и физички хемичари, токсиколози и персонал за обезбедување квалитет.

Аналитичката хемија во оваа фаза е фокусирана на развој на специфични методи и карактеризација на природата на онечистувањата. За таа цел се изведуваат и тестови за стабилност под забрзани услови, со цел да се идентификуваат патиштата на деградација предизвикани од термални, фотохемиски или оксидативни фактори. Ваквите информации се од суштинско значење за понатамошно поставување на формалните спецификации и воспоставување систем за контрола на квалитетот на матичната молекула и нејзините деградациски производи.

Табела 14. Тестови што се изведуваат во претклиничката фаза на развојот (автор)

Испитуван параметар	Постапка / Метод
Идентитет	Инфрацрвена спектроскопија (IR) Точка на топење
Структурна карактеризација	Масена спектроскопија (MS) Нуклеарна магнетна резонанца (NMR)
Содржина на активната супстанција	Хроматографски постапки Титрација
Сродни супстанции (онечистувања)	Течна хроматографија со високи перформанси (HPLC) Гасна хроматографија (GC) Тенкослојна хроматографија (TLC)
Неоргански онечистувања	Остаток при жарење Тешки метали
Резидуални растворувачи	Гасна хроматографија (GC)
Содржина на вода	Карл Фишера титрација
pH на раствор	Мерење со pH-метар

4.1.1.2. Претклинички студии: претклинички дозирани форми

За спроведување на токсиколошки и рани фармакокинетички студии е потребно да се администрираат релевантни количини од активната супстанција кај различни животински видови (глувци, стаорци, зајаци, примати). Типични дозирани форми во овие студии се растворите, суспензиите и добиточната храна во која активната супстанција е рамномерно дистрибуирана.

Претклиничките студии се предмет на регулаторните барања на добрата лабораториска практика. Едно од клучните барања се однесува на документацијата за дозираните форми, која мора да обезбеди докази за содржината на активната супстанција во дозираната форма, како и за нејзината стабилност во текот на претклиничките студии. Покрај тоа, потребно е да се утврди и присуството на онечистувања.

Типични параметри што се испитуваат кај растворите и суспензиите се: изглед, содржина на активната супстанција во дозираната форма, нивоа на онечистувања и pH вредност. Кај добиточната храна, пак, покрај содржината на активната супстанција и присуството на онечистувања, клучен параметар при тестирањето е и воедначеноста на содржината на активната супстанција низ целата смеса.

Иако во оваа фаза не се применуваат формални спецификации, задолжително е обезбедувањето на аналитички сертификат кој прецизно го опишува квалитетот на администрираниот производ.

4.1.1.3. Претклинички студии: онечистувања

За време на претклиничкиот развој, особено во текот на токсиколошките испитувања, од суштинско значење е да се познаваат структурата и содржината на онечистувањата во активната супстанција. Погрешни заклучоци за токсичноста на активната супстанција може да произлезат тогаш кога токсиколошките манифестации, всушност, се резултат на присутните онечистувања, а не на самата супстанција.

Иако во оваа фаза не се бара воспоставување формални спецификации за следење и мониторинг на онечистувањата, сепак, неопходно е да се располага со информации за нивната количина и природа. Ова се однесува и на онечистувањата што произлегуваат од процесот на синтеза, како и на оние што се јавуваат како резултат на деградација на лекот.

4.1.1.4. Претклинички студии: метаболити

Метаболитите се неопходни за спроведување на фармакокинетички студии, како во претклиничкиот, така и во клиничкиот развој. Тие мора да бидат со доволна чистота за да овозможат точни и сигурни фармакокинетички мерења.

Иако во оваа фаза, вообичаено, не се воспоставуваат формални спецификации, задолжително е обезбедување аналитички сертификат кој ќе опфати низа параметри, како што се: чистота, структура и сродни супстанции.

4.1.2. Клиничко испитување

4.1.2.1. Клиничко испитување: активна супстанција

Кога нов хемиски ентитет ќе достигне стадиум во кој покажува задоволителен терапевтски потенцијал и прифатлив токсиколошки профил, тој станува предмет на клинички студии (D'Argy & Harron, 1996). Во тој момент, вообичаено, се воспоставуваат привремени спецификации за новата активна супстанција во истражување (Investigational New Drug – IND, САД) или, пак, се подготвува апликација за клиничко испитување (Clinical Trial Application – CTA, Европа), поднесена во форматот на Заедничкиот технички документ (Common Technical Document, CTD), пред започнување на клиничките студии од фаза I (D'Argy & Harron, 1994).

Во оваа фаза, за синтетски мали молекули без необични физички или хемиски карактеристики, спецификацијата може да ги содржи параметрите прикажани во Табела 15. Сепак, за помалку вообичаени молекули (како, на пример, масла) или, пак, за

посложени активни супстанции (како, на пример, пептиди, протеини и производи на повеќекомпонентна ферментација), потребни се посеопфатни спецификации.

Важно е да се нагласи дека спецификациите во оваа фаза на развој се привремени и подлежат на промени врз основа на подетални податоци што ќе се добијат во подоцнежните студии. На пример, не е вообичаено во оваа рана фаза спецификацијата да вклучува барање за испитување на полиморфните форми на активната супстанција. Сепак, подоцна може да се покаже дека ова својство е критично за биорасположливоста и ефикасноста на лекот, па затоа ќе биде неопходно да се контролира и специфицира.

Табела 15. Параметри во спецификација за синтетска мала молекула (автор)

Испитуван параметар	Аналитичка процедура	Критериум за прифатливост
Идентитет	Инфрацрвена спектроскопија (IR)	Во согласност со стандардот
	Точка на топење	Во зададен опсег на топење
Структурна карактеризација	Масена спектроскопија (MS)	Во согласност со стандардот
	Нуклеарна магнетна резонанца (NMR)	Во согласност со стандардот
Содржина на активната супстанција	Течна хроматографија со високи перформанси (HPLC), Гасна хроматографија (GC)	97,0–102,0%
	Титрација	98,0–102,0%
Сродни супстанции (онечистувања)	Течна хроматографија со високи перформанси (HPLC), Гасна хроматографија (GC)	Вкупни онеч.: < 2,0% Поединечни онеч.: < 1,5% Познато X: < 1,0%
Неоргански онечистувања	Остаток при жарење / Сулфатен пепел	< 500 ppm
Резидуални растворувачи	Гасна хроматографија (GC)	Растворувач X: < 0,50% Растворувач Y: < 0,20% Растворувач Z: < 0,05%
Содржина на вода	Карл Фишера титрација	< 0,5%
pH на 1% раствор	Мерење со pH-метар	4,60–5,00

4.1.2.2. Клиничко испитување: клинички формулации

Во оваа фаза клиничките формулации, вообичаено, се едноставни. Типични примери се капсули наполнети со активна супстанција или инјекции. Спецификациите, во најголем дел, се темелат на активната супстанција, бидејќи целта на студијата е да се испитаат подносливоста, безбедноста и фармакокинетиката на лекот кај мал број човечки испитаници.

4.1.3. Клинички испитувања од фаза II и фаза III

По демонстрирање на подносливоста и прифатливиот фармакокинетски профил во студиите до фаза I, лекот преминува во студиите од фаза II, кога истиот се тестира кај мал број пациенти. Во оваа фаза се произведуваат поголем број серии од активната

супстанција, што овозможува подобра проценка на профилот на чистота, односно бројот и количината на поединечните онечистувања во споредба со содржината на активната супстанција.

За време на клиничките испитувања од фаза III, развојот на лекот, вообичаено, трае од две до пет години. Во овој период се акумулираат значително повеќе податоци за активната супстанција, а на располагање е и конечната или формулацијата многу блиска до комерцијалната.

4.1.4. Подготовка и поднесување апликација за нов лек (барање на одобрение за ставање на лек во промет)

Кога лекот ќе ја достигне фазата на поднесување барање за нов лек (New Drug Application – NDA, САД) или апликација за добивање на одобрение за ставање во промет (Marketing Authorization Application – MAA, Европа), тој веќе е во развој неколку години. Во овој период најчесто е утврдено дека активната супстанција се произведува по предложениот комерцијален синтетски пат.

На располагање, вообичаено, постојат обемен број податоци за готовиот производ, вклучувајќи ги неговите физички својства, профилот на онечистувања, стабилноста и други релевантни својства, врз основа на кои се дефинираат значајните спецификации. Сепак, овие податоци сè уште се релативно ограничени во споредба со лековите кои веќе се одобрени и подолг период се наоѓаат на пазарот. Затоа, при утврдувањето на критериумите за прифатливост мора да се внимава тие да не бидат премногу рестриктивни, со цел да се избегне ситуација во која истите не можат редовно да се постигнуваат во нормални, долгорочни производствени услови.

Во оваа фаза готовиот производ, вообичаено, е во својата конечна или во формулација многу блиска до онаа наменета за пазарот. Со започнување на подготовките за поднесување на досието, во воспоставувањето на спецификациите се вклучуваат тимови од производствените операции, како и тимови за контрола и обезбедување на квалитет. Производството на серии од активната супстанција и готовиот производ постепено се префрла од единиците за истражување и развој кон оперативните единици на компанијата. Притоа, двата тима се вклучени во процесот на пренос на производството, валидација на аналитичките методи и воспоставување на спецификациите со соодветни критериуми за прифатливост.

Врз основа на целокупниот корпус на достапни податоци од развојот се изготвуваат планови и стратегии за поднесување на досието за апликација. Притоа, тимовите одговорни за развој и производство мора да спроведуваат програми во согласност со насоките дефинирани во водичите на Меѓународната конференција за хармонизација (ICH). Овие водичи се применливи и за хемиски и за биотехнолошки производи. Сепак, во ова поглавје фокусот е ставен на активни супстанции произведени со хемиска синтеза, како и на производите добиени од нив.

4.2. Меѓународна конференција за хармонизација (ICH)

До крајот на 1980-тите години во различни земји постоеле различни регулаторни водичи кои ги опфаќале сите аспекти на податоците потребни за регулаторно поднесување, почнувајќи од барањата за клинички податоци, па сè до тестирањето на стабилноста на активната супстанција. Оваа разновидност на регулативи резултирала со зголемена потрошувачка и непотребна работа, ја забавувала достапноста на нови лекови за пациентите, ги зголемувала трошоците за развој на лекови и, генерално, го правела процесот на развој неефикасен.

Во таков контекст регулаторните органи и фармацевтската индустрија од трите главни фармацевтски региони (САД, Европа и Јапонија) се здружиле и ја основале Меѓународната конференција за хармонизација (ICH). Таа е создадена околу 1990 година и има за цел хармонизација на техничките барања за регистрација на лекови меѓу овие три пазари (D'Arcy & Harron, 1992).

Обемни информации за ICH, вклучувајќи ги и сите нејзини водичи, се достапни на официјалната веб-страница: <http://www.ich.org>.

Референтните услови на ICH се формулирани со цел да обезбедат ефективна хармонизација на техничките барања за регистрација на лекови. Тие опфаќаат:

- *Обезбедување форум за дијалог*: Платформа за конструктивна соработка помеѓу регулаторните органи и фармацевтската индустрија во врска со реалните разлики во техничките барања за одобрување на производи во САД, Европа и Јапонија;
- *Идентификација на области за усогласување*: Препознавање области во кои модификација на техничките барања или зголемено меѓусебно прифаќање на процедурите за истражување и развој може да доведе до поекономично користење на човечки, животински и материјални ресурси, без компромитирање на безбедноста;
- *Препораки за хармонизација*: Давање насоки за практични начини за постигнување поголема хармонизација во толкувањето и примената на техничките водичи и барањата за регистрација.

ICH претставува заедничко регулаторно-индустриско претпријатие. Шесте ко-спонзори на ICH се:

- *САД*: Администрацијата за храна и лекови (FDA) и здружението Фармацевтско истражување и производители на Америка (PhRMA);
- *Европа*: Европската комисија (EC) и Европската федерација на фармацевтски индустрии и здруженија (EFPIA);
- *Јапонија*: Министерството за здравство, труд и благосостојба (MHLW) и Јапонското здружение на фармацевтски производители (JPMA).

Неколку организации имаат статус на набљудувачи на работните комитети на ICH, а нивниот придонес е, исто така, значаен во процесот на утврдување на водичите. Такви организации се:

- Канадската филијала за здравствена заштита (HPB), чишто одговорности денес се поделени меѓу Health Canada и Државната агенција за јавно здравје на Канада (PHAC);
- Фармакопејата на Соединетите Американски Држави (USP).

Дополнително, Меѓународната федерација на фармацевтски производители и здруженија (IFPMA) функционира како „чадор-организација“, координирајќи го процесот на подготовка и усогласување на документацијата во рамките на ICH.

Идентификувани се три главни области на регулаторните барања за хармонизација: безбедност, ефикасност и квалитет. За секоја од овие области е формирана посебна работна група, задолжена за понатамошна дискусија и развој на соодветни водичи.

Во рамките на делот за квалитет, за почетна хармонизација биле избрани следниве пет теми:

- Q1: тестирање на стабилност;
- Q2: валидација на аналитички методи;
- Q3: тестирање на онечистувања;
- Q4: фармакопејска хармонизација;
- Q5: квалитет на биотехнолошки и биолошки производи.

Шестата тема што била предложена за хармонизација е Q6, Спецификации: Постапки за тестирање и критериуми за прифатливост на нови активни супстанции и нови готови производи. Во рамките на оваа тема биле развиени два посебни водича:

- Q6A, кој се однесува на хемиските супстанции;
- Q6B, кој се однесува на биотехнолошките производи.

Развојот и усвојувањето на ICH водичите е структуриран процес кој се одвива во пет чекори:

- I. Група експерти, со мандат од Управниот одбор на ICH, започнуваат прелиминарни дискусии за предложената тема и изработуваат почетен нацрт. Потоа нацртот се разгледува од заедничката работна група на експерти од индустријата и регулаторните тела, под водство на одговорен експерт (известувач). Најчесто, овој процес вклучува повеќе верзии и ревизии на документот, сè додека не се постигне консензус, што може да трае и до неколку години;
- II. Нацртот се доставува до трите регулаторни агенции за формални консултации, кои се спроведуваат во согласност со нивните национални процедури;
- III. Нацртот се ревидира, доколку е потребно, врз основа на добиените коментари од процесот на консултации. Ревидираниот нацрт повторно се разгледува од заедничката работна група на експерти од индустријата и регулаторните тела;
- IV. Управниот одбор на ICH го одобрува конечниот нацрт и препорачува негово усвојување од страна на трите регулаторни тела;
- V. Препораките се интегрираат во националните прописи или во други соодветни административни мерки, во согласност со внатрешните процедури на секоја земја или регион.

4.2.1. Q6A водич, Спецификации: Постапки за тестирање и критериуми за прифатливост за нови активни супстанции и нови готови производи (хемиски супстанции)

Првата експертска работна група за овој водич била формирана на почетокот на 1996 година, со цел да се постават насоки за заеднички пристап кон дефинирањето на спецификациите за синтетски хемиски активни супстанции и производи добиени од нив. Истовремено бил инициран и придружниот водич Q6B, кој се однесува на посебните барања за спецификации за лекови од биотехнолошко потекло.

Првичната цел на Q6A водичот била да се обезбедат насоки за сите видови дозирани форми, односно:

- цврсти дозирани форми (таблети со брзо и одложено ослободување, тврди и меки желатински капсули, таблети за цвакање, орални таблети со брзо распаѓање итн.);
- течни дозирани форми (раствори, суспензии, емулзии);
- парентерални препарати (стерилни течности, ампули со сув лиофилизиран прашок итн.);
- инхалациски препарати (инхалатори со одмерена доза, аеросоли итн.);
- дермални системи за испорака (трансдермални фластери);
- полуцврсти дозирани форми (кремови, масти, гелови).

Сепак, било заклучено дека оваа задача е преголема за краткиот временски период и дека за одредени препарати, особено инхалациските и дермалните системи за испорака, ќе биде потребна посебна експертиза. Поради тоа било одлучено опфатот на Q6A водичот да се ограничи на најзастапените дозирани форми на пазарот, односно: таблети со брзо и одложено ослободување, капсули, орални течности и парентерални препарати.

Покрај шесте редовни членови (FDA, PhRMA, EC, EFPIA, MHLW, JPMA), во експертската работна група биле вклучени и претставници од фармакопејските организации: Фармакопејата на Соединетите Американски Држави (USP), Европската фармакопеја (Ph. Eur.) и Јапонската фармакопеја (JP), како и претставници од индустријата за генерички лекови. Целта била да се обезбеди поширока застапеност на тела надвор од иновативната фармацевтска индустрија и регулаторните агенции, кои биле директно засегнати од барањата содржани во Q6A водичот. Од денешна перспектива, вклучувањето на фармакопејски организации одиграло клучна улога, бидејќи глобалните спецификации често бараат хармонизација на монографиите во рамките на поединечните фармакопеи.

4.2.1.1. Цели на Q6A водичот

Q6A водичот има за цел да придонесе кон воспоставување единствен сет на глобални спецификации. Тој обезбедува насоки за дефинирање и оправдување на критериумите за прифатливост, како и за избор на соодветни процедури за тестирање нови активни супстанции од синтетско хемиско потекло и нови производи добиени од нив, кои претходно не биле регистрирани во САД, ЕУ или Јапонија.

4.2.1.2. Опсег на Q6A водичот

Во опсегот на Q6A водичот е нагласено дека воспоставувањето спецификации претставува само еден чекор во поширокиот процес на обезбедување достапност на лекови кои се безбедни, ефикасни и со висок квалитет. Покрај спецификациите, други клучни фактори претставуваат: дизајнот и развојот на производот, контролите во текот на производствениот процес, валидацијата на процесот и соодветните практики за контрола на производството.

Q6A водичот се однесува исклучиво на фазата на одобрување за ставање на лекот во промет, а не на фазата на клиничко тестирање.

Поради сложеноста на одредени дозирани форми спомнати претходно, опсегот на Q6A водичот е ограничен на: цврсти орални дозирани форми, течни орални дозирани форми и парентерални препарати со мал и голем волумен (инјекции и инфузии). Овие дозирани форми служат како репрезентативни модели, при што принципите што се применуваат за нив можат да бидат проширени и на други дозирани форми, како што се инхалациските, топикалните и трансдермалните препарати.

4.2.1.3. Општи концепти на Q6A водичот

Во Q6A водичот се опишани повеќе општи концепти, меѓу кои и следниве:

– Периодично тестирање

Овој концепт подразбира изведување специфични тестови само на претходно избрани серии и/или во однапред дефинирани временски интервали, наместо на секоја серија на лекот. Истиот може да се применува по пуштањето на лекот во промет, бидејќи при поднесувањето барање за добивање одобрение за ставање лек во промет се достапни ограничен број податоци.

– Критериуми за прифатливост на Release наспроти Shelf-life спецификациите

Release specification (Спецификација за квалитет на лекот пред пуштање на секоја серија во промет) е документ што ги опфаќа сите рутински испитувања кои производителот мора да ги спроведе на секоја серија пред таа да биде пуштена на пазарот. Shelf-life specification (Спецификација за квалитет на лекот во текот на целиот рок на употреба) е документ што ги содржи испитувањата пропишани од производителот и критериумите на кои лекот мора да одговара сè до истекот на декларираниот рок. Според овој концепт критериумите за прифатливост при пуштање на лекот во промет се построги во споредба со критериумите за прифатливост што важат до истекот на неговиот рок на употреба.

– Тестови во текот на процесот (In-process controls)

Под поимот тестови во текот на процесот се подразбираат сет испитувања што се изведуваат за време на производството на активната супстанција или на готовиот производ. Вообичаено, овие тестови претставуваат дел од контролите што се спроведуваат пред пуштање на лекот во промет, но нивната примарна цел е да обезбедат стабилност и конзистентност на производствениот процес. Ваквите тестови се користат за следење и прилагодување на одредени параметри во дефиниран интервал, како, на пример, цврстината на таблетните јадра пред обложување. Овој параметар е критичен за производствениот процес и затоа, вообичаено, не е вклучен во спецификацијата за квалитет на готовиот производ. Сепак, доколку се утврди дека има директно и критично влијание врз квалитетот на готовиот производ, како, на пример, кај таблетите за цваќање, тогаш мора да биде вклучен во спецификацијата.

– Искусства и податоци од развојниот период

Искусвата и податоците од развојниот период, како на активната супстанција така и на готовиот производ, треба да претставуваат основа за воспоставување целосна и конечна спецификација.

– Ограниченост на достапни податоци

Имајќи предвид дека при поднесување на досието за регистрација на лекот се достапни само ограничен број податоци, критериумите за прифатливост се утврдуваат врз основа на почетните информации, со можност за нивна ревизија подоцна. Со зголемување на бројот достапни податоци, често се јавува потреба од ревидирање, при што критериумите за прифатливост може да бидат заострени или олабавени.

– Пуштање во промет на серија врз основа на специфичен параметар (Parametric release)

Во одредени случаи пуштањето во промет на серија врз основа на специфичен параметар може да се примени како алтернатива на рутинското пуштање во промет. Така, при изведба на студиите за стерилност на инјекции, кои како готови производи се стерилизираат терминално, од особено значење е следењето параметри, како што се температурата, притисокот и времетраењето на стерилизација. Врз основа на овие податоци се обезбедуваат сигурни докази за стерилноста на инјекциите во споредба со оние добиени само преку директно тестирање, поради што ослободувањето на серијата се темели токму на мониторингот на овие параметри.

– Алтернативни методи

Под поимот алтернативен метод се подразбира секој аналитички метод со кој испитувањето се изведува на ниво еднакво или повисоко во споредба со официјално пропишаниот метод. На пример, доколку е покажано дека активната супстанција присутна во одредена таблета не подлежи на значајна деградација, при пуштање на серијата во промет може да се дозволи употреба на аналитички метод кој не е stability-indicating, како што е спектрофотометрискиот метод наместо официјалниот хроматографски метод (Chafetz, 1971).

– Фармакопејски тестови и критериуми за прифатливост

Неколку тестови веќе се хармонизирани во USP, Ph. Eur. и JP. Во овие тестови се вбројуваат: стерилност, остаток при жарење/сулфатен пепел, бактериски ендотоксини, боја/бистрина, присуство на честици, растворливост (во делот за апаратура) и распаѓање (во делот за апаратура). Од друга страна, одредени тестови сè уште претставуваат предмет на понатамошна дискусија за хармонизација. Тоа се: растворливост (во делот за медиум и критериуми за прифатливост), распаѓање (во делот за медиум и критериуми за прифатливост), воедначеност на маса, воедначеност на содржина, волумен што може да се екстрахира, ефикасност на конзерванс (во делот за опсег на тестот и критериуми за прифатливост) и микробиолошка контаминација. Во водичот е нагласено дека идната хармонизација на дополнителни методи за тестирање е од суштинско значење, при што е наведено следново: „Целосната корист од овој водич зависи од успешното завршување на хармонизацијата на фармакопејските процедури за неколку атрибути што, вообичаено, се земаат предвид во спецификациите за нови активни супстанции или нови готови производи. Фармакопејската дискусионна група (PDG), составена од претставници на USP, Ph. Eur. и JP, изрази посветеност за навремено постигнување на оваа хармонизација“.

– Развој на нови технологии и модификација на постоечките

Овој концепт е воведен за да се земе предвид континуируваниот развој на аналитичките технологии и, каде што е соодветно, да се овозможи замена или надградба на постојната методологија со нови процедури. На тој начин се обезбедува дополнителна сигурност дека активната супстанција и готовиот производ ќе го задржат потребното ниво на квалитет.

- Влијание на анализата на активната супстанција при воспоставување на спецификацијата на готовиот производ

Овој концепт се однесува на тоа дека параметрите за квалитет кои веќе се испитуваат и контролираат кај активната супстанција, вообичаено, не треба повторно да се испитуваат кај готовиот производ. На пример, доколку во спецификацијата за квалитет на активната супстанција е вклучено испитување на онечистувања што се остатоци од синтеза и не претставуваат деградациски продукти, тогаш таквите онечистувања не треба да бидат предмет на тестирање во спецификацијата на готовиот производ.

- Референтен стандард

Под поимот референтен стандард се подразбира секоја супстанција што се користи како стандард во различни видови тестови, како што се идентификација, испитување на чистота и определување на содржина (assay).

4.2.1.4. Оправдување на спецификациите

Q6A водичот го опишува процесот на воспоставување и оправдување на спецификациите. Оправдувањето може да се заснова на различни податоци, како, на пример: податоци добиени од фазата на развој, фармакопејски стандарди, резултати од токсиколошки и клинички испитувања, како и резултати од студии за стабилност. Дополнително, при воспоставување на спецификациите, неопходно е да се земат предвид и очекуваната аналитичка и производствена варијабилност.

Доколку се разгледуваат повеќе производствени локации за активната супстанција или готовиот производ, при воспоставувањето на спецификациите потребно е да се обезбедат податоци од сите соодветни локации. Во случај на изоставување на тест кој, вообичаено, би бил вклучен, задолжително е оправдување врз основа на податоци генерирани во текот на развојот.

Кога на располагање има само ограничени податоци, првично одобрените критериуми за прифатливост треба да се разгледуваат и ревидираат како што се акумулираат дополнителни информации. Во согласност со потребите, ова може да подразбира заострување или олабавување на критериумите за прифатливост.

4.2.1.5. Универзални тестови и критериуми за прифатливост

Q6A водичот го воведува концептот на универзални тестови кои се применливи и за активните супстанции и за готовите производи. Станува збор за тестови што, по правило, се спроведуваат без исклучок и претставуваат основа на која потоа се додаваат специфични тестови, во зависност од природата на конкретната супстанција или на конкретниот производ (ICH Q6A, 1999).

За активните супстанции и за готовите производи, во групата на универзални тестови се вбројуваат (ICH Q6A, 1999):

- **Опис;**
- **Идентификација;**
- **Содржина;**
- **Онечистувања.**

Кај готовите производи, под поимот онечистувања се подразбираат деградациските продукти, а не онечистувањата кои потекнуваат од самиот производствен процес (ICH Q6A, 1999).

4.2.1.6. Специфични тестови и критериуми за прифатливост

Покрај универзалните тестови, во одредени случаи може да се применат и дополнителни тестови за активни супстанции или готови производи. Овие тестови се вклучуваат во спецификацијата само ако имаат значително влијание врз квалитетот и се важни за контрола на секоја серија (ICH Q6A, 1999).

4.2.1.6.1. Специфични тестови и критериуми за прифатливост за нови активни супстанции

Во продолжение се наведени некои од најчесто применуваните специфични тестови за нови активни супстанции:

– Физичко-хемиски својства

Оваа категорија опфаќа својства како што се рН на воден раствор, точка (или опсег) на топење и индекс на прекршување. Изборот на соодветните тестови зависи од физичката природа на новата активна супстанција и од нејзината целна употреба.

– Големина на честици

Кај одредени нови активни супстанции што се користат во цврсти или суспендирани производи, големината на честичките може значително да влијае врз брзината на растворање, биорасположливоста и/или стабилноста.

– Цврста состојба (полиморфи, псевдополиморфи и аморфни форми)

Некои нови активни супстанции можат да постојат во повеќе кристални форми (полиморфи), кои меѓусебно се разликуваат по своите физички својства. Полиморфизмот, исто така, може да опфати и продукти на солватација или хидратација (псевдополиморфи), како и аморфни форми. Во одредени случаи разликите меѓу овие форми можат значително да влијаат врз квалитетот, биорасположливоста или стабилноста на готовиот производ. Доколку е докажано дека постојат такви разлики, потребно е да се специфицира соодветната цврста состојба на активната супстанција. За таа цел најчесто користени аналитички техники се: точка на топење (вклучувајќи микроскопија со топла фаза); инфрацрвена спектроскопија (IR) на цврста состојба; рендгенска дифракција на прашок (XRPD); термички анализи: диференцијална скенирачка калориметрија (DSC), термогравиметриска анализа (TGA) и диференцијална термичка анализа (DTA); раманова спектроскопија; скенирачка електронска микроскопија (SEM) и нуклеарна магнетна резонанца (NMR) на цврста состојба.

– Тестови за нови хирални активни супстанции

Кога новата активна супстанција претежно претставува еден енантиомер, спротивниот енантиомер не се зема предвид при примената на стандардните идентификациски и квалификациски прагови утврдени во ICH водичите за онечистувања, бидејќи на тие нивоа неговото прецизно квантифицирање е исклучително тешко. Сепак, овој енантиомер, како онечистување во активната супстанција или во готовиот производ, мора да се третира и контролира во согласност со принципите пропишани во овие водичи.

Во Q6A водичот е даден преглед на тоа кога и во кои случаи се потребни тестови за хирален идентитет, тестови за онечистувања и тестови за определување содржина кај нови активни супстанции. Во однос на идентификациските тестови се нагласува дека тие треба да направат разлика меѓу двата енантиомера и рацемската смеса. Кај тестовите за онечистувања, пак, посебно значење има фактот што кај хирални активни супстанции развиени како еден енантиомер, спротивниот енантиомер се смета за онечистување и соодветно се контролира. Конечно, енантиоселективното определување на содржината на активната супстанција треба да биде задолжителен дел од спецификацијата, а тоа може да се постигне преку примена на хирален аналитички метод или со комбинирање на ахирален метод за определување содржина, со дополнителни постапки за контрола на енантиомерното онечистување.

– Содржина на вода

Овој тест е особено значаен во случаи кога новата активна супстанција е хигроскопна, се разградува под дејство на влага или претставува стехиометриски хидрат. За изведба на овој тест се препорачува специфична техника за определување на вода, како што е Карл Фишеровата титрација.

– Неоргански онечистувања

Потребата од вклучување тестови и критериуми за прифатливост на неоргански онечистувања треба да се разгледува во фазата на развој и да се темели на

познавањето на производствениот процес. За нивно определување може да се користат постапки како остаток при жарење/сулфатна пепел или соодветни аналитички техники, како што е атомската апсорпциска спектроскопија.

– Микробиолошко тестирање

Во Q6A водичот е даден преглед на тоа кога и во кои случаи е неопходно да се вклучи микробиолошко тестирање. Овој тест се применува доколку постои ризик присуството на микроорганизми да влијае врз квалитетот, безбедноста или стабилноста на активната супстанција, односно готовиот производ.

4.2.1.6.2. Специфични тестови и критериуми за прифатливост за нови готови производи

За одредени нови готови производи, покрај универзалните тестови опишани претходно, потребно е да се вклучат и специфични тестови со соодветни критериуми за прифатливост. Q6A водичот не ги опфаќа сите дозирани форми, пред сè, поради временските ограничувања и потребата од дополнителна експертиза за одредени посспецифични форми, како што се, на пример, инхалациските препарати и трансдермалните системи за испорака. Наместо тоа, водичот се фокусира кон најчестите дозирани форми што сочинуваат најголем дел од фармацевтскиот пазар, а тоа се цврстите орални, течните орални и парентералните дозирани форми (со мал и голем волумен). Сепак, концептите и принципите опишани во водичот остануваат применливи и за други дозирани форми.

Генерално, за **таблети и тврди желатински капсули** се применуваат следниве специфични тестови:

– Растворливост и распаѓање

Кај брзорастворливи производи со високорастворливи активни супстанции, вообичаено, доволно е само тестирање на распаѓањето. Кога е потребно да се утврди растворливоста, вообичаено, доволно е мерење во една временска точка. Притоа, за дозирани форми со модифицирано ослободување мора да се дефинираат соодветни услови за тестирање, а за производи со продолжено ослободување се спроведуваат мерења во повеќе временски точки. Кога е потребно прецизно утврдување на критериуми за прифатливост во повеќе временски точки, може да се користи *in vitro-in vivo* корелација (IVIVC).

– Цврстина/трошливост

Во случаи кога цврстината и трошливоста имаат критично влијание врз квалитетот на готовиот производ (на пример, кај таблети за цваќање), критериумите за прифатливост задолжително треба да бидат вклучени во спецификацијата.

– Воедначеност на дозирани единици

Воедначеноста на дозираните единици обединува два параметри: масата на дозираната форма и содржината на активната супстанција во неа. Вообичаено, во спецификацијата треба да биде вклучен само еден од двата параметри, но не и двата истовремено. Кога е соодветно, овие тестови може да се изведуваат и како дел од процесната контрола.

– Содржина на вода

Тестот за содржина на вода треба да биде вклучен кога тоа е соодветно, а критериумите за прифатливост може да се оправдаат со резултати за влијанието на хидратацијата или апсорпцијата на влага од готовиот производ. За изведба на овој тест се препорачува специфична техника за определување на вода, како што е Карл Фишеровата титрација.

– Микробиолошко тестирање

Во Q6A водичот е даден преглед на тоа кога и во кои случаи е неопходно да се вклучи микробиолошко тестирање на цврсти орални дозирани форми.

Генерално, за **орални течности и прашоци за реконституција** се применуваат следниве специфични тестови:

– Воедначеност на дозирани единици

При изведба на овој тест, потребно е да се утврдат критериуми за прифатливост за варијација на масата на дозираната форма, волуменот на полнење и/или воедначеноста на полнењето. Кај прашоци за реконституција, вообичаено, тестирањето се ограничува на воедначеност на масата.

– pH

Кога е применливо, потребно е да се утврдат критериуми за прифатливост на pH, а предложениот опсег мора да биде соодветно оправдан.

– Микробиолошко тестирање

Потребно е да се утврдат критериуми за прифатливост кои вклучуваат: вкупен број аеробни микроорганизми, вкупен број квасци и мувли, како и отсуство на специфични патогени бактерии. Q6A водичот дава насоки за избор на соодветните микробиолошки тестови.

– Содржина на антимикуробен конзерванс

Кај орални течности кај кои е неопходно присуство на антимикуробен конзерванс, задолжително е утврдување на критериуми за прифатливост за неговата содржина. Антимикуробната ефикасност треба да се потврди во фазата на развој, а при пуштање на лекот во промет мора да се изврши тестирање за да се потврди соодветната концентрација на конзервансот.

– Содржина на антиоксидантен конзерванс

Кога во производот е потребен антиоксиданс за обезбедување стабилност, неговата количина треба да се утврди и оправда уште во фазата на развој. При првичното пуштање на производот во промет, таа количина мора да биде потврдена. Бидејќи антиоксидансот природно се разградува за време на рокот на употреба, односно во периодот кога го врши своето заштитно дејство, тестирањето на неговата содржина на крајот од рокот има ограничено значење. Затоа податоците добиени во развојната фаза се од клучна важност.

– Екстрактибилни материји

Податоците добиени во развојната фаза често може да укажат дека тестот за екстрактибилни материји не е неопходен. Сепак, постојат случаи кога миграцијата на овие материји може да доведе до интеракција помеѓу производот и неговиот сад, етикета или систем за затворање, па во такви случаи спроведувањето на ваков тест се смета за соодветно.

– Содржина на алкохол

Кога во формулацијата е декларирано присуство на алкохол, потребно е во спецификацијата да се утврдат соодветни ограничувања за неговата содржина.

– Растворливост

Кај орални суспензии и суви прашоци за реконституција, особено во случаи кога активната супстанција е слабо растворлива, може да биде соодветно да се вклучи тест за растворливост со јасно дефинирани критериуми за прифатливост и соодветно оправдување. Како основа за воспоставување на овие критериуми треба да послужат профилите на растворливост на производи кои демонстрирале прифатливи *in vivo* перформанси.

– Распределба на честичките по големина

Овој тест може да биде неопходен за орални суспензии и, во одредени случаи, може да се предложи како замена за тестот за растворливост. Во таков случај задолжително е да се обезбеди соодветно оправдување. И за овој тест, како и за тестот за растворливост, критериумите за прифатливост треба се темелат на профилите на растворливост на производи кои покажале прифатливи *in vivo* перформанси.

– Редисперзибилност

Кај орални суспензии кои се таложат за време на складирањето потребно е да се воспостават критериуми за прифатливост за нивната редисперзибилност. Најчесто,

како постапка се применува протресување, со цел талогот да се ресуспендира и да се врати во хомогена суспензија.

– Реолошки својства

Кај вискозни раствори или суспензии во спецификацијата е соодветно да се вклучат реолошки својства, како што е вискозноста, со јасно дефинирани критериуми за прифатливост.

– Специфична тежина

Кај течни производи во спецификацијата може да биде вклучена и специфичната тежина, како дополнителен показател за конзистентноста на формулацијата.

– Време на реконституција

За суви прашоци за реконституција потребно е да се дефинираат критериуми за прифатливост во однос на времето потребно за постигнување целосна реконституција.

– Содржина на вода

Кога е соодветно, во спецификацијата за орални производи наменети за реконституција треба да се вклучи тест за содржина на вода, со јасно дефинирани критериуми за прифатливост.

Генерално, за **парентерални дозирани форми** се применуваат следниве специфични тестови:

– Воедначеност на дозирани форми

При изведба на овој тест потребно е да се утврдат критериуми за прифатливост за варијација на масата на дозираната форма, волуменот на полнење и/или воедначеноста на полнењето.

– pH

Кога е применливо, потребно е да се утврдат критериуми за прифатливост на pH, а предложениот опсег мора да биде соодветно оправдан.

– Стерилност

Во спецификацијата на сите парентерални дозирани форми задолжително треба да биде вклучен тест за стерилност со соодветни критериуми за прифатливост. Кога податоците од развојот и валидацијата го оправдуваат тоа, за терминално стерилизираните производи може да се примени пуштање во промет врз основа на специфичен параметар (parametric release).

– Ендотоксини/Пирогеност

Во спецификацијата на сите парентерални дозирани форми задолжително треба да биде вклучен тест за ендотоксини со соодветни критериуми за прифатливост. За таа цел најчесто се применува LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) тестот. Доколку постои соодветно оправдување, како алтернатива на тестот за ендотоксини може да се користи тестот за пирогеност.

– Честици

Кај парентералните дозирани форми неопходно е да се воспостават соодветни критериуми за прифатливост во однос на присуството на честиици. Вообичаено, овие критериуми вклучуваат проверка на видливи честиици и/или проценка на бистрината на растворот, како и испитување на субвидливи честиици, каде што тоа е оправдано.

– Содржина на вода

Кај неводени парентерални препарати, како и кај препарати наменети за реконституција, потребно е да се предложи соодветна постапка за тестирање и критериуми за прифатливост на содржината на вода. Вообичаено, доволно е определување на губитокот при сушење, доколку за време на развојот адекватно е утврдена разликата помеѓу апсорбираната влага и кристално врзаната вода на хидратација.

– Содржина на антимикробен конзерванс

За парентерални производи кај кои е неопходен антимикробен конзерванс, потребно е да се воспостават критериуми за прифатливост на неговата содржина. Овие критериуми треба да се темелат на количината на антимикробен конзерванс што е

потребна за одржување на микробиолошкиот квалитет на производот во сите фази на неговата употреба и за време на целиот рок на траење.

– Содржина на антиоксидантен конзерванс

Вообичаено, содржината на антиоксиданс се проверува при пуштање на серијата во промет. Меѓутоа, доколку тоа е оправдано со резултати од развојната фаза и студиите за стабилност, контролата на крајот од рокот на употреба може да се изостави. Во такви случаи доволно е проверката да се извршува во текот на производствениот процес.

– Екстрактивилни материји

Контролата на екстрактивилните материји е од особено значење кај парентералните производи, бидејќи нивното присуство може негативно да влијае врз безбедноста и квалитетот. Сепак, доколку во развојната фаза не се утврдат значајни количини на вакви материји, спроведувањето на овој тест може да се изостави.

– Тестирање на функционалноста на системите за испорака

Кај парентералните формулации спакувани во претходно наполнети шприцеви, патрони за автоинјектори или други слични уреди, потребно е да се воспостават тестови со јасно дефинирани критериуми за прифатливост, со цел да се оцени функционалноста на системот за испорака.

– Осмоларност

Кога тоничноста на производот е наведена на етикетата, потребно е да се спроведе соодветна контрола на неговата осмоларност.

– Распределба на честиците по големина

Врз основа на податоците добиени во развојната фаза се утврдува потребата од примена на тест за растворливост или тест за распределба на честиците по големина.

– Редисперзибилност

Кај суспензиите за инјектирање што се таложат за време на складирањето неопходно е да се воспостават критериуми за прифатливост кои ќе ја оценуваат нивната способност за повторна хомогена распределба (редисперзија).

– Време на реконституција

За парентерални препарати наменети за реконституција потребно е да се дефинираат критериуми за прифатливост во однос на времето потребно за постигнување целосна реконституција.

4.3. Фармакопеи и спецификации

Во светот постојат повеќе фармакопеи кои, меѓу другото, ги дефинираат неопходните карактеристики за квалитет што треба да ги исполнуваат активните супстанции и готовите фармацевтски производи. Најпознати се:

- **Фармакопејата на Соединетите Американски Држави (USP);**
- **Европската фармакопеја (Ph. Eur.);**
- **Британската фармакопеја (BP);**
- **Јапонската фармакопеја (JP).**

USP содржи поглавја со различни теми и монографии за активни супстанции и готови производи. Поглавјата опфаќаат аналитички техники за физичко, хемиско и биолошко тестирање, како и општи аналитички теми (спецификации за реагенси, амбалажи за пакување и сл.). Во подготовката на USP се вклучени голем број волонтери од индустријата, академијата и владата, кои имаат одговорност за преглед и одобрување на монографиите поднесени од компании, како и на поглавјата напишани од поединци. Лабораторијата на USP врши аналитичко тестирање и валидација на нови методи, додека одделот за стандарди обезбедува аналитички референтни супстанции достапни за јавна продажба. Ph. Eur. опфаќа само активни супстанции (European Pharmacopoeia Commission, 2024), додека BP и JP опфаќаат активни супстанции и готови производи.

Еден од предизвиците на индустријата е тоа што разликите меѓу одредени тестови и монографии во различни фармакопеи може да доведат до повторување на тестирањата за ист лек или иста формулација. За надминување на овие проблеми, во Q4 и Q6 водичите на ICH дадени се насоки за хармонизација. Имено, Q4 водичот хармонизира голем број монографии за ексципиенси, како резултат на што се намалуваат барањата за тестирање и се овозможува поефикасна контрола на квалитетот во услови на глобален фармацевтски развој и производство. Q6 водичот, пак, кој делумно е обработен во оваа тема, укажува дека сè уште постои потреба од хармонизирање на голем број аналитички тестови.

Покрај наведените, постои и Меѓународна фармакопеја, која е наменета главно за земјите во развој. Таа се фокусира на едноставни и класични физичко-хемиски аналитички техники што се потврдени како сигурни. Целта е фармакопејата да биде применлива без скапа аналитичка опрема. Каде што е можно се користат класични процедури, а како алтернатива се предлагаат посложени методи. Приоритет се дава на лекови кои се клучни во програмите на Светската здравствена организација (СЗО) и кои често не се вклучени во другите фармакопеи.

4.4. Статистички разгледувања во воспоставувањето на спецификациите

Критериумите за прифатливост на тестовите дадени во спецификациите можат да се воспостават само по внимателно разгледување на варијабилноста на процесите и методите. И производствените процеси и аналитичките тестови внесуваат одредено ниво на варијабилност кое зависи од природата на процесот или тестот.

Некои аналитички методи, по својата природа, се поточни од други. Така, титриметриските методи, вообичаено, даваат понизок коефициент на варијација (CV) во споредба со хроматографските методи. Поради тоа при воспоставување спецификации за хроматографски анализи потребно е да се земе предвид нивната поголема варијабилност. На пример, за титриметриска анализа на активна супстанција може да се прифати толеранција од $\pm 0,5\%$, додека кај HPLC методите типичните CV вредности изнесуваат околу $\pm 1,0\%$.

Во литературата се достапни бројни текстови и публикации што опишуваат статистички методи применливи при воспоставување спецификации и спроведување контрола на квалитет. Големо значење има постапката на земање примероци, бидејќи таа директно влијае на валидноста на резултатите, особено кај хетерогени материјали како активни супстанции и гранули. Спецификацијата мора да биде формулирана на начин што резултатите добиени од случајно избран репрезентативен примерок ќе овозможат донесување јасна одлука дали серијата може да се пушти во промет или треба да се отфрли.

Контролата на процесот е, исто така, од суштинско значење и најчесто се базира на контролни графикони кои се насочени кон одредена целна вредност на параметарот што се следи. Доколку измерената вредност (на пример, содржината на активна супстанција во таблети, концентрацијата на онечистувања во активна супстанција или резултатите од тестот за растворливост на капсули) излезе надвор од прифатливиот опсег, тоа претставува јасен индикатор дека производствениот процес е надвор од контрола.

Варијабилноста на аналитичките методи и варијабилноста на производствениот процес се тесно поврзани при воспоставувањето на спецификациите. Спецификациите треба да бидат поставени доволно строго за да обезбедат конзистентен квалитет на производот, но не и премногу рестриктивно за да не се случува нормалната варијација во производството да резултира со чести и неоправдани отфрлања на сериите.

Главните статистички концепти што се применуваат при воспоставувањето спецификации и контрола на квалитет вклучуваат: случајни и системски грешки, фреквенциски дистрибуции, мерки на дисперзија, стандардни девијации и стандардни грешки, планови за земање примероци.

Накратко, спецификациите мора да се воспоставуваат земајќи ги предвид варијабилноста на производството, аналитичката варијабилност и техниките на земање примероци.

5. ДОКУМЕНТАЦИЈА ВО ФАРМАЦЕВТСКИТЕ АНАЛИЗИ

Фармацевтските аналитички податоци претставуваат темел за развој и пласман на нови лекови на пазарот. Тие се собираат и презентираат на различни начини со цел да се докаже квалитетот, чистотата и стабилноста на лекот, без разлика дали станува збор за лек во истражувачка фаза или за лек кој веќе е пласиран на пазарот. Овие податоци имаат клучна улога и во премостувањето на промените што настануваат во текот на целиот животен циклус, од синтезата и формулацијата, преку производството, па сè до варијациите кои се појавуваат по одобрувањето.

Аналитичките податоци се евидентираат во различни типови извештаи, најчесто како комбинација од:

- Регулаторна документација за поднесување до здравствени власти;
- Извештаи за усогласеност со барањата на добрата производствена практика (GMP), кои се користат при инспекции;
- Интерни извештаи за истражување и развој.

Во последните години беа изготвени и објавени бројни нови водичи поврзани со барањата за хемија, производство и контрола (Chemistry, Manufacturing, and Control – CMC) на фармацевтски производи (ICH Q8(R2), 2005). Повеќето од нив се однесуваат на регулаторните барања при поднесување досие за регистрација. Постојат и голем број упатства поврзани со барањата за GMP.

Интерните извештаи стануваат сè поважни бидејќи обезбедуваат детална евиденција за историјата на еден производ, во услови кога барањата за регулаторна документација постепено се рационализираат.

Сите три вида документи (регулаторни, GMP извештаи и интерни документи) се неопходни за целосно следење на историјата на фармацевтскиот производ и за обезбедување интегритет на податоците.

5.1. Фармацевтска анализа во текот на животниот циклус на производот

Животниот циклус на нов лек е прикажан на Слика 16. Процесот се состои од последователни фази што започнуваат со претклиничкиот и клиничкиот развој, а завршуваат со пласирање на пазарот. Во пракса развојните фази ретко се строго разграничени, па напредокот најјасно се означува преку клучните точки на одлучување.

Активностите во областа на аналитичкото истражување и развој се движат паралелно со фазите на развој на лековите. Временските рамки за реализација на овие активности зависат од терапевтската индикација и од придружните клинички и токсиколошки програми. Лековите што нудат решение за сериозни и досега неисполнети медицински потреби често имаат забрзана клиничка програма, при што техничките активности се скратени или се изведуваат паралелно. Спротивно на тоа, за лекови наменети за долготрајна (хронична) употреба, студиите за канцерогеност и клиничките студии се од особено значење, што обезбедува повеќе време за оптимизација и технички развој.



Слика 16. Животен циклус за развој на нови лекови

(<https://www.pattheon.com/us/en/insights-resources/blog/drug-development-phases.html>)

На Слика 17. е прикажано дека аналитичката документација опфаќа различни извештаи. Главните видови аналитичка документација често се повторуваат и/или се ажурираат во текот на развојот, како и при измените по одобрувањето. За таа цел аналитичките организации мора да располагаат со научно издржани и усогласени практики, како и со јасно дефинирани процеси за да обезбедат подготвување на овие критични извештаи на конзистентен и навремен начин.



Слика 17. Главни видови аналитички документи (Ahuja & Scypinski, 2001)

Бидејќи за време на развојот често се повторуваат експерименти, аналитичките тимови можат да имаат значителна корист од подготовка на стандардизирани обрасци или упатства за секој тип извештај. На овој начин од една страна се обезбедува конзистентност и целосност, а од друга страна се овозможува брзо и ефикасно прилагодување на динамичните промени што се јавуваат во процесите на развој и производство.

Критичните активности во секоја фаза од животниот циклус на нов производ се прикажани во продолжение. За секоја фаза се наведени клучната аналитичка поддршка, активностите и придружната документација. Иако овие активности, генерално, се применливи, нивниот обем може да варира во зависност од природата на новиот хемиски ентитет и од терапевтската индикација. Тие важат и за оригинални (иновативни) и за генерички производи, иако кај генериците активностите, најчесто, се скратени, бидејќи за оригиналниот производ веќе постојат достапни податоци.

5.1.1. Откривање: Скрининг на кандидат-молекули

Примарната цел на фазата на скрининг е да се оценат голем број соединенија врз основа на нивните биолошки и фармацевтски својства. Оценката вклучува:

- ефикасност кај животински модели;
- биофармацевтски својства (на пример, растворливост и пропустливост во Caco-2 клетки);
- прелиминарен фармакокинетички профил кај животни;
- потенцијал за метаболичка и токсична реакција.

За рано откривање на ризик од мутагеност може да се примени Ames тест, иако тој во оваа фаза често не е во согласност со барањата на добрата лабораториска практика (GLP).

Фокусот на аналитичките активности во оваа фаза е насочен кон карактеризација на физичко-хемиските својства и стабилноста на новите активни супстанции. Притоа се

проверува чистотата на материјалот, се добиваат прелиминарни резултати за стабилноста во цврста состојба и во раствор (како предуслов за примена на Ames тестот), а паралелно се идентификуваат потенцијални технички пречки што би можеле да го ограничат понатамошниот развој. За овие цели најчесто се користи комбинација од релативно едноставни хроматографски техники, меѓу кои HPLC, TLC и GC, додека истовремено се развива и основен профил на растворливост.

Прелиминарната карактеризација на цврстата состојба најчесто се изведува со примена на диференцијална скенирачка калориметрија (DSC), термогравиметриска анализа (TGA) и дифракција на X-зраци (XRD). Кај протеинските фармацевтски производи се следат слични принципи, но се користат соодветни техники за нивна карактеризација, како што се тестови за *in vitro* и *in vivo* биоактивност, различни електрофоретски и хроматографски методи, анализа на аминокиселини, мапирање на пептиди и секвенционирање.

Аналитичката документација во фазата на откривање, вообичаено, ги вклучува следниве ставки:

- биофармацевтска класификација врз основа на податоци од *in vitro* растворливост;
- интерни методи со делумна проценка на параметрите за валидација;
- првичен профил на онечистувања;
- краткотрајна стабилност во цврста состојба и во раствор;
- податоци за стабилност на формулации администрирани кај животни при изведба на студии за ефикасност и фармакокинетика.

5.1.2. Селекција на кандидат-молекула во клиничка фаза

По завршениот скрининг, вообичаено, се избираат едно или две соединенија кои понатаму се подложуваат на проценка на токсичност кај најмалку еден глодарски и еден неглодарски вид (вообичаено, со дозирање во траење од една до две недели). Првиот значаен технички предизвик во оваа фаза е развојот на токсиколошка формулација што ќе обезбеди соодветна изложеност кај животните, најчесто неколкукратно поголема од очекуваната доза по телесна тежина кај луѓето. Одлуката за формално започнување на клиничките испитувања кај луѓе за избраниот нов хемиски ентитет зависи од поволниот безбедносен профил добиен од овие краткорочни испитувања на животни. Во овој период аналитичкиот тим ги продлабочува своите сознанија за соединението и активно ја поддржува програмата за токсиколошка проценка. Дополнително, во оваа фаза може да се иницираат и студии на форсирана деградација (стрес-тестови).

Идеално, уште при изборот на клинички кандидат треба да се идентификува оптималната форма на молекулата – и во поглед на цврстата состојба (полиморфна форма) и во поглед на хемиската форма (сол). Изборот на најстабилната форма, која истовремено обезбедува најдобра биорасположливост, значително го олеснува и забрзува понатамошниот развој.

Во оваа фаза се развиваат и квалификуваат аналитички методи за одредување на содржината во токсиколошките формулации, како и методи за валидација на процесот на чистење, кои претставуваат предуслов за изведување на првите студии во согласност со барањата на добрата лабораториска практика (GLP). На избраната токсиколошка тест серија се спроведуваат студии за стабилност со цел да се потврди соодветноста на материјалот во текот на неговиот предвиден период на употреба. Вообичаено, се изведуваат краткотрајни забрзани студии за стабилност со времетраење од најмалку три месеци, со што се обезбедува покривање на периодот од производството до аплицирањето на последната доза.

Најчесто, аналитичката документација во фазата на избор на клинички кандидат вклучува:

- прелиминарни аналитички податоци и профили за предформулација;
- образложение за изборот на цврстата состојба и хемиската форма;
- ревидирани и нови интерни методи, квалификувани за употреба;

- профили на онечистувања за новите серии и нивна споредба со претходните (Ames) серии;
- аналитички профили или сертификати за анализа на активната супстанција и на токсиколошката тест-серија;
- краткотрајни студии за стабилност на избраната токсиколошка тест-серија.

5.1.3. Фаза 0: Претклинички развој на кандидат-молекулата

По изборот на кандидат-молекулата, фокусот на тимот за развој се насочува кон планирање и подготовка за претклиничката фаза, односно производство на соодветни количини активна супстанција и формулации за нивна понатамошна употреба во клиничките испитувања. Во овој период често се формира формален развоен тим кој изработува план за понатамошен развој, дефинира целен профил на избраниот кандидат и поставува критериуми за прифатливост кои ќе се користат за следење на напредокот.

За време на фаза 0, тимот за аналитичко истражување и развој продолжува да го продлабочува знаењето за хемијата и стабилноста на соединението и обезбедува поддршка за тековните токсиколошки студии. Овие студии вклучуваат GLP испитувања со дополнителни животински видови и/или подолга изложеност (вообичаено, со дозирање во траење од две до четири недели), како и GLP Ames тест, безбедносна фармакологија, генотоксичност и пилот-студии за тератогеност.

Тимот за формулации започнува со развој на клиничка формулација погодна за аплицирање кај луѓе, што подразбира значајна аналитичка поддршка. Таа опфаќа студии за можни интеракции со ексципиенси, како и испитување на стабилноста на прототипните формулации. Финалниот избор на клиничка формулација за употреба кај луѓе се прави врз основа на задоволителни резултати од студиите за стабилност и, по можност, врз основа на податоци од биорасположливост добиени кај соодветен животински модел, со цел да се предвиди биорасположливоста кај луѓето.

Во оваа фаза аналитичките методи се усовршуваат паралелно со евалуацијата на промените во синтезата или во квалитетот на активната супстанција. Методите за анализа на активната супстанција и на формулациите наменети за клинички испитувања се квалификуваат врз основа на избрани параметри за валидација, а прибраните податоци се користат за дефинирање на спецификациите што ќе бидат вклучени во регистрациското досие.

Генерално, аналитичката документација во фаза 0 ги вклучува следниве ставки:

- ажуриран аналитички и предформулациски извештај за активната супстанција со резиме на нејзините физички и хемиски својства;
- карактеризација на референтниот стандард;
- нови и ревидирани интерни методи (валидација на процесот на чистење, тестирање за пуштање во промет, стабилност на активната супстанција и токсиколошки формулации);
- извештаи за квалификација и валидација на аналитички методи за токсиколошки студии, во согласност со барањата на GLP;
- профили на онечистувања за новите серии и нивна споредба со претходните токсиколошки серии;
- сертификати за анализа на активната супстанција;
- аналитички профили или сертификати за анализа на токсиколошките серии;
- податоци од аналитичко тестирање на примероци земени во рамки на токсиколошките студии (хомогеност, периодично тестирање, крај на студијата), вклучувајќи и примероци земени од самото место на дозирање кај животни, во согласност со барањата на GLP;
- податоци од тековни студии за стабилност на токсиколошките тест-серии или на новите токсиколошки формулации;
- резултати од предформулациски студии и од испитувања на прототипни клинички формулации.

5.1.4. Фаза 1: Аплицирање на избраната клиничка формулација кај луѓе

Фаза 1 од клиничките испитувања го претставува првиот чекор во испитувањето на новиот лек кај луѓе. Таа може да се спроведе кај пациенти или кај здрави доброволци и, вообичаено, опфаќа од 20 до 80 субјекти. Главната цел е утврдување на несаканите ефекти при зголемување на дозата и, доколку е можно, добивање рани индикации за ефикасноста. Дополнително, во оваа фаза, се проучуваат метаболизмот на лекот, неговата фармакокинетика и механизмот на дејство кај луѓе.

Пред започнувањето на првото клиничко испитување потребно е да се поднесе апликација за регистрација до надлежниот регулаторен орган (на пример, FDA или ЕМА). Доколку испитувањето се спроведува исклучиво кај здрави доброволци, регулаторното поднесување не е секогаш задолжително. И во таков случај, иако барањата за документација се поедноставени, останатите активности се спроведуваат на ист начин. Во овој контекст проектниот тим мора да обезбеди производство и контрола на формулациите наменети за употреба во клиничкото испитување.

Во рамките на Единицата за аналитичко истражување и развој (R&D) се одобруваат спецификациите и методите за формулациите наменети за клиничко испитување, а истовремено се објавуваат и резултатите од краткотрајни студии за стабилност. Валидацијата на аналитичките методи е завршена за критичните параметри, особено кај методите што се користат при тестирање за пуштање во промет и за оценка на стабилноста на овие формулации. За токсиколошките и клиничките серии профилите на онечистувања и деградациските продукти се прикажуваат во табеларна форма, со цел да се потврди безбедноста на производите што ќе се администрираат кај луѓе.

Примарната цел на аналитичката поддршка во оваа фаза е обезбедување соодветна документација за квалитет, конзистентност и стабилност на клиничките формулации, со што се овозможува безбедно премостување на развојот од претклиничките студии кај животни кон клинички испитувања кај луѓе.

Вообичаено, аналитичката документација во фаза 1 ги вклучува следниве елементи:

- карактеризација на референтниот стандард (чистота, онечистувања, физичко-хемиски својства релевантни за биорасположливоста);
- образложение за изборот на полиморфна и/или хемиска форма (сол), доколку е применливо;
- профил на серија за токсиколошките и клиничките серии;
- дополнителни информации за познати онечистувања, патишта и продукти на деградација;
- образложение за спецификациите во апликацијата за регистрација (за активната супстанција и готовиот производ);
- спецификации (тестови, граници на прифатливост и методи) за активната супстанција и готовиот производ, вклучувајќи и плацебо;
- квалификација и валидација на методите вклучени во спецификациите на досието за регистрација;
- податоци за стабилност: достапни резултати од студии за форсирана деградација (стрес-тестови) на активната супстанција, достапни резултати од забрзани (вообичаено, најмалку еден месец) и долготрајни студии на клиничките формулации;
- сертификати за анализа на активната супстанција и на готовиот производ наменет за употреба во клиничките испитувања.

5.1.5. Фаза 2: Студии за докажување на безбедноста и ефикасноста на лекот

Испитувањата во фаза 2 претставуваат рани контролирани клинички студии чија цел е да се процени опсегот на дозата и ефикасноста на лекот за одредена индикација кај пациенти, како и да се идентификуваат најчестите краткотрајни несакани ефекти и ризици поврзани со неговата примена. Во оваа фаза, вообичаено, се вклучуваат до

неколку стотини пациенти. Многу од активностите претставуваат продолжение на студиите започнати во фаза 1, но истовремено се јавува потреба од аналитичка поддршка за развој и оптимизација на процесот и за подготовка на потенцијалните комерцијални формулации.

Во оваа фаза аналитичките методи често се ревидираат во согласност со промените во синтезата или во формулацијата. Тие се оптимизираат за да ги исполнат крајните аналитички барања, а измените во процедурите понекогаш наложуваат повторна валидација. Карактеризацијата на активната супстанција, исто така, продолжува, при што контролата на стереохемијата кај стереоизомерните соединенија и/или различните форми во цврста состојба (хидрати, солвати, полиморфи) останува критичен аспект. Тестирањето за пуштање во промет и студиите за стабилност се изведуваат во рамките на долготрајните GLP студии, кои по потреба вклучуваат и студии за канцерогеност, покрај тековните клинички испитувања.

Аналитичката документација во фаза 2, вообичаено, вклучува:

- идентификација на нови онечистувања или деградациски продукти;
- ревидирани спецификации и методи на анализа (вклучувајќи подобрувања, нови синтетички патишта и формулации);
- ажурирани извештаи за стабилност;
- сертификати за анализа за серии на активната супстанција и за клиничките формулации.

Резултатите од испитувањата во фаза 2 претставуваат основа за донесување одлука за преминување кон целосен развој. Оваа одлука е од клучно значење бидејќи подразбира значајни дополнителни вложувања средства и ресурси во долготрајни клинички студии неопходни за регулаторно одобрување и пласман на лекот на пазарот. Во овој период, исто така, често се бараат големи капитални инвестиции во производствените капацитети со цел да се обезбедат потребните серии на производ за регистрација.

5.1.6. Фаза 3: Клучни испитувања за ефикасност и подготовка за регистрација

Студиите од фаза 3 се спроведуваат откако ќе бидат добиени убедливи докази за ефикасноста на лекот. Тие претставуваат проширени клинички испитувања чија цел е да се соберат дополнителни податоци за безбедноста и ефикасноста, како и да се утврди односот ризик – корист од неговата употреба. Во оваа фаза, вообичаено, учествуваат од неколку стотици до неколку илјади пациенти. Често се изведуваат и студии за биорасположливост (BA) или биоеквивалентност (BE), со цел да се потврди дека предложената финална формулација (предвидена за регистрација) е споредлива со клиничката формулација што била користена во претходните студии за безбедност и ефикасност.

Плановите за подготовка на досието за регистрација се иницираат веднаш по добивање поволни клинички резултати. Единицата за аналитичко истражување и развој има централна улога во активностите од оваа фаза. Продолжува тестирањето и пуштањето во употреба на формулациите за клиничките испитувања (активна супстанција и готов производ), вклучувајќи и снабдување со предложената финална формулација (предвидена за регистрација) за изведба на BA/BE студии. Дополнително, се спроведува проширена физичка и хемиска карактеризација на сериите за регистрација за да се демонстрира техничка еквивалентност меѓу финалниот производ предложен за регистрација и клучните клинички формулации. Продолжуваат и долготрајните студии за стабилност на претходните клинички формулации, а паралелно започнуваат забрзани и долготрајни студии за стабилност на сериите за регистрација.

Аналитичките податоци во оваа фаза имаат за цел да обезбедат поврзаност меѓу формулациите што биле користени во токсиколошките студии, студиите за одредување на доза кај луѓето, клучните клинички испитувања и студиите за биоеквивалентност. Најважни, од аспект на безбедност и еквивалентност, се податоците за чистота и онечистувања, стабилноста и перформансите на производот *in vitro* (како, на пример,

растворливост и ослободување на активната супстанција). Во одредени случаи може да биде потребна претходна согласност од регулаторните органи дека достапните податоци се соодветни и дека не е неопходна *in vivo* споредба.

Честопати при поднесување на оригиналното досие за регистрација компаниите приложуваат податоци за стабилност пократки од 12 месеци, со обврска за нивно ажурирање за време на регулаторниот преглед. На тој начин се овозможува порано поднесување и скратување на времето до потенцијално одобрување.

При подготовка на нацрт-досието за регистрација, задолжително се вклучуваат документи што се однесуваат и на активната супстанција и на готовиот производ.

Така, за **активната супстанција** се бараат следниве информации:

- номенклатура, формула, доказ за структура и физичко-хемијска карактеризација;
- стабилност (форсирана деградација, забрзани и долготрајни испитувања; услови на складирање и период за повторно тестирање/рок на употреба);
- сеопфатна табела со резимеа на профилите на произведените серии;
- спецификации (методи, тестови, граници на прифатливост, образложение, валидација) (ICH Q1A(R2), 2003).

За **готовиот производ**, пак, се бараат следниве информации:

- стабилност (форсирана деградација, забрзани и долготрајни испитувања);
- сеопфатна табела со резимеа на профилите на произведените серии;
- спецификации (методи, тестови, граници на прифатливост, образложение, валидација) (ICH Q1A(R2), 2003).

Кај протеинските фармацевтски производи потребни се дополнителни биохемијски испитувања и студии за споредливост на биоактивноста со цел да се потврди конзистентноста на сериите користени во токсиколошките и клиничките испитувања, како и во понатамошната фаза на комерцијализација.

Последните клучни чекори во развојот на нов фармацевтски производ се поднесувањето и одобрувањето на досието за регистрација, како и пуштањето на производот на пазарот. Во оваа фаза тимот мора да ги финализира сите извештаи (претклинички, клинички и технички) кои ќе бидат вклучени во досието. Целата документација се собира и се доставува на преглед до здравствените власти, при што одредени студии може да продолжат и по поднесувањето. Ажурираните извештаи можат да се достават за време на периодот на регулаторен преглед или, пак, да се чуваат во компанијата, подготвени за одговор на евентуални прашања.

Во одредени случаи може да биде потребна претходна согласност од регулаторните органи за да се дозволи поднесување измени во текот на прегледот на досието. Пред неговото одобрување, техничките оддели, особено одделите за производство и контрола на квалитет, мора да бидат подготвени за инспекција и валидација на производствениот процес. Дополнителни документи, како што се извештаи од отстапки и сертификати за анализа, често се приложуваат за да се обезбеди подобра следливост на произведените серии, во согласност со GMP барањата. Паралелно, се подготвуваат протоколи и конечни извештаи за валидација и трансфер на технологија. На овој начин поднесената документација не се состои само од експлицитно наведените делови на досието за регистрација, туку и од дополнителни извештаи за усогласеност и истражувања кои служат како поддршка за регулаторните одлуки и придонесуваат кон успешно завршување на процесот на одобрување.

За време на регулаторниот преглед здравствените власти можат да побараат измена или дополнување на одредени делови од досието. Одговорите на ваквите барања најчесто вклучуваат нови податоци, дополнителни анализи или ажурирања на постојните информации, а понекогаш и обврски за активности по одобрувањето. Кај производи што се пласираат глобално, барања и коментари може да пристигнуваат од повеќе здравствени власти во различни временски периоди. Во такви случаи

компанијата се соочува со потреба од хармонизација на барањата за да одржува единствено и усогласено досие за сите пазари.

Аналитичката документација во фаза 3 вклучува:

- финализирање на сите документи во досието за регистрација;
- документи за усогласеност;
- ревизија и ажурирање на досието како одговор на коментари од регулаторните органи;
- контрола на промени, доколку е потребно.

5.1.7. Фаза 4: Период по одобрување и маркетинг на новиот фармацевтски производ

Честопати уште пред лекот официјално да биде одобрен за пуштање во промет, компаниите започнуваат со планирање на идни проширувања и алтернативни извори за снабдување. Затоа новите индикации, проширувања на линијата и/или промени во снабдувањето се разгледуваат и иницираат уште во оваа рана фаза.

Проширувањата на линијата може да опфатат нови фармацевтски форми, алтернативни начини на администрирање или поедноставени режими на дозирање. Додека клиничките испитувања за нови индикации не бараат значајна техничка поддршка, испитувањата што вклучуваат нови формулации бараат обемна аналитичка поддршка. Овие промени може да се поднесат како дополнување на постојното досие, но за нова дозирана форма најчесто се изготвува целосно ново досие. Аналитичката документација за проширено или ново поднесување, во суштина е идентична со онаа за првичното досие, со тоа што може да се бараат и компаративни податоци за да се потврдат сличностите или да се утврдат разликите во однос на референтниот производ што веќе е присутен на пазарот.

Аналитичката документација за проширување на линијата на готов производ ги опфаќа следниве ставки:

- стабилност (форсирана деградација, забрзани и долготрајни испитувања; статистичка анализа);
- сеопфатна табела со резимеа на профилите на произведените серии;
- спецификации (методи, тестови, граници на прифатливост, образложение, валидација).

Периодот по одобрувањето е, исто така, динамичен, особено кога се вршат промени во производствените локации, процесите или контролите. Сите овие промени мора да се управуваат глобално преку системот за контрола на промените на компанијата. Тие неизбежно бараат аналитички податоци кои ја поддржуваат промената, најчесто преку демонстрирање еквивалентност со веќе одобриениот производ. Затоа аналитичката документација за промените по одобрувањето секогаш треба да биде прилагодена на конкретниот вид промена.

5.2. Потребна документација за досие за регистрација

Иако фазите во животниот циклус на новиот лек следат дефиниран редослед, процесот на подготовка на регулаторната документација за поднесување на досието за регистрација не е целосно линеарен. Повеќето активности во развојот се преклопуваат, поради што и придружната документација е тесно поврзана и заемно условена.

Најголемите напори во подготовката на регулаторната документација се насочуваат кон отворањето на досието. Затоа планирањето и навремената изработка на сите критични поднесоци е од клучно значење за исполнување на развојните рокови. Особено важно е апликацијата да биде целосна и висококвалитетно подготвена и да се поднесе навреме.

Во овој процес авторите на документацијата мора тесно да соработуваат со сите релевантни соработници со цел да се обезбеди комплетност, конзистентност и точност на содржината. Аналитичката група за време на развојот, вообичаено, работи на повеќе

задачи истовремено, како што се развој, оптимизација и валидација на методи, ослободување на серии или тестирања на стабилност. Поради меѓусебната поврзаност, промените во една студија или извештај често предизвикуваат потреба од усогласување и во другите документи.

Групата треба да обезбеди интеграција и конзистентност во сите поврзани документи, како во рамките на аналитичките делови, така и во поширокиот контекст на досието. Регулаторните ажурирања се подготвуваат периодично или при настанати промени во активната супстанција или во клиничката формулација. Разликите меѓу извештаите најчесто се однесуваат на бројот достапни податоци (на пример, број на серии или времетраење на студиите за стабилност) и нивото на деталност, а и барањата за измена на информациите може значително да се разликуваат.

Главните типови аналитичка документација што се поднесуваат во рамки на досието за регистрација се однесуваат како на активната супстанција, така и на готовиот производ. Оваа документација е суштинска за обезбедување конзистентен квалитет, стабилност и усогласеност со регулаторните барања.

Кај **активната супстанција** потребно е да се прикажат податоци за:

- физичко-хемиска карактеризација;
- карактеризација на референтен стандард;
- спецификации и аналитички методи;
- сертификати за анализа;
- квалификација и валидација на методи;
- стабилност (форсирана деградација, забрзани и долготрајни студии).

Кај **готовиот производ** потребно е да се прикажат податоци за:

- спецификации и аналитички методи;
- сертификати за анализа;
- валидација на методи;
- стабилност (забрзани и долготрајни студии).

Досието за регистрација мора да содржи информации кои ја воспоставуваат врската помеѓу дозираните форми користени во клиничките испитувања и оние предвидени за комерцијална употреба. Компанијата е должна да покаже дека сите промени во активната супстанција или во готовиот производ, настанати за време на зголемувањето на производствените серии, не влијаеле врз безбедноста, биорасположливоста или биоеквивалентноста на дозираната форма.

Оваа врска може да се демонстрира со користење на *in vivo* и/или *in vitro* податоци, како што се профили на онечистувања или профили на растворливост. Исто така, потребно е да се обезбедат податоци што ќе ја потврдат безбедноста и биорасположливоста на предложената финална формулација (наменета за регистрација), во споредба со клиничките формулации што биле користени во примарните студии за ефикасност.

Дополнително, податоците за произведените серии предвидени за регистрација треба да ја потврдат конзистентноста на предложениот производствен процес. Во исто време, тие мора да демонстрираат дека активната супстанција и готовиот производ поседуваат стабилен квалитет и се соодветни за пласирање на пазарот.

Поточно, досието за регистрација треба да содржи податоци со кои ќе се поддржат одредени тврдења.

Кај **активна супстанција** синтезата, односно хемијата и производствениот процес мора да бидат добро разработени и соодветно контролирани. Потребно е да се воспостават контроли за суровините и почетните материјали, додека тестовите во текот на производствениот процес треба да обезбедат докази дека активна супстанција се произведува со висок и конзистентен квалитет.

Дополнително мора да бидат дефинирани соодветни спецификации за пуштање на сериите во промет и за повторно тестирање (методи и критериуми за прифатливост),

засновани на податоци од развојните серии. Профилот на онечистувањата кај сериите за регистрација треба да биде еднаков или подобар од оној кај сериите користени во токсиколошките или клиничките студии, при што сите значајни онечистувања мора да бидат квалификувани на нивоа потврдени во претклиничките или клиничките испитувања. Доколку е потребно, контролата на физичките својства служи за да се гарантира производството и биорасположливоста на дозираната форма. Квалитетот на активната супстанција мора да остане стабилен во текот на целиот предложен период на складирање и повторно тестирање.

Кај **готовиот производ** предложената финална формулација (наменета за регистрација) мора да биде биоеквивалентна со формулацијата користена во клучните клинички испитувања. Производствениот процес треба да биде добро разбран и соодветно контролиран, при што дефинираните параметри и тестовите во процесот на производство треба да обезбедат конзистентно производство на готов производ со висок и стабилен квалитет. Неопходно е да бидат воспоставени спецификации за ексципиенсите и готовиот производ, како за пуштање на сериите во промет, така и за стабилност (доколку е применливо).

Стабилноста на предложената формулација мора да биде еднаква или подобра од онаа користена во токсиколошките и клиничките студии. Деградациските продукти треба да бидат квалификувани во рамките на прифатливите граници утврдени во тие студии, а сериите наменети за регистрација треба да го поддржуваат предложениот рок на употреба. Главниот доказ за техничка еквиваленција помеѓу клиничката формулација и онаа наменета за регистрација произлегува од аналитичките податоци, вклучувајќи студии на споредливост и *in vivo* биоеквивалентност. Ова е особено важно во случај на промени во синтезата, формулацијата, пакувањето, производствената локација и/или процесот.

Прашањата поврзани со биорасположливоста и потенцијалната токсичност се разгледуваат преку физичко-хемијската карактеризација на активната супстанција, која вклучува избор на цврста состојба, контрола на големината на честиците и податоци за растворливост кај цврсти и суспендирани дозирани форми. Безбедносните аспекти поврзани со чистотата и онечистувањата се обезбедуваат преку споредба на профилите на онечистувања помеѓу развојните и сериите наменети за регистрација. Квалитетот, дополнително, се гарантира со систем на контроли кој ги опфаќа рутинските тестови, границите на прифатливост и критериумите за квалификација на специфични онечистувања.

Стабилноста на готовиот производ се демонстрира преку резултати од студии за стабилност под забрзани и долготрајни услови на складирање на примарните серии наменети за регистрација (ICH Q1A(R2), 2003). Таа може да се потврди и со споредба на податоците од развојните серии кои често обезбедуваат подетални информации. Дополнително, деталното познавање на патиштата на деградација, поткрепено со резултати од студиите за форсирана деградација, придонесува за дополнително гарантирање на стабилноста на производот.

Во рамките на ICH тековно се работи на развој на заеднички технички документ (Common Technical Document – CTD) со цел хармонизација на регулаторните барања за глобален развој и пласман на лекови на пазарот. Иако е постигнат значаен напредок во дефинирањето на заедничката содржина, сè уште се потребни дополнителни напори за целосна усогласеност на форматот и содржината на глобалната апликација. Постојните ICH водичи за квалитет обезбедуваат основна рамка сè додека не се финализираат заедничките делови на CTD.

Подготовката на документацијата за регистрација според барањата на ЕУ и САД моментално резултира со формално различни пријави, иако содржината, во голема мера, е слична. Главните разлики се однесуваат на редоследот и насловите на деловите. Токму поради оваа сличност, можно е да се примени модуларен пристап при изработка на глобално досие за регистрација, во кое секој модул содржи информации релевантни за двата регулаторни система.

Глобалното досие би се состоело од унифицирани модули што ги задоволуваат барањата и на ЕУ и на САД, додека одредени дополнителни документи би останале специфични за секој регион (на пример, резимето за апликација, пакетот за еколошка проценка и валидација на методи за САД или експертските извештаи за ЕУ). Повеќето техничките извештаи, сепак, може да се користат за двете пријави, со минимални прилагодувања. Ваквиот модуларен пристап значително го намалува времето и напорот потребни за подготовка на документација за различни регулаторни пазари.

5.3. Потребна документација за усогласеност

Документите за усогласеност претставуваат извештаи кои се задолжителни според принципите на GMP или се користат за време на инспекции од страна на здравствените регулаторни тела. Тие служат како дополние на регулаторната и истражувачката документација и имаат суштинска улога во демонстрирањето на интегритетот на податоците (MHRA, 2018).

Темел на овие документи се добро воспоставените системи за квалитет и усогласеност, развиени од мултидисциплинарен тим составен од претставници на одделите за истражување и развој (R&D), контрола на квалитет (QC) и обезбедување квалитет (QA). Една од клучните одговорности на менаџментот и QA е развој, имплементација и континуирано следење на овие системи во согласност со тековните барања за GMP (cGMP) и GLP (MHRA, 2018).

Постојат два главни типа инспекции:

- **Општи GMP инспекции**, кои се насочени кон проценка на системите за квалитет, стандардните оперативни процедури (SOP) и евалуација на производ-специфичните податоци како индикатор за усогласеност;
- **Инспекции пред одобрување (Pre-Approval Inspections – PAI)**, кои започнуваат со детална анализа на податоците за конкретен производ, по што следи проверка на релевантните аспекти од системот за квалитет.

Во продолжение ќе бидат разгледани типичните аналитички документи кои претставуваат составен дел од процесот на усогласеност.

I. Документација за општ систем за квалитет

Оваа документација претставува основа за демонстрирање на усогласеност со GMP и, вообичаено, ги опфаќа следниве категории:

- *Стандардни оперативни процедури (SOP)*;
- *Постапки за истражување на отстапки и несогласувања*, вклучувајќи:
 - резултати надвор од спецификација (Out of Specification – OOS);
 - дефекти на производот;
 - одобрена повторна анализа (со придружни лабораториски листови);
 - евиденција за обука на персоналот;
- *Одржување и квалификација на опрема*: инсталациона (IQ), оперативна (OQ) и перформансна (PQ) квалификација (European Commission, 2020);
- *Протоколи за стабилност*, вклучувајќи:
 - генерален протокол;
 - тестирање на серии според протоколот;
 - валидација на комори за стабилност;
- *Валидација на аналитички методи*;
- *Валидација на системи*: системи за собирање податоци и LIMS, во согласност со 21 CFR, дел 11;
- *Систем за следење и складирање примероци*;
- *Контрола и управување со референтни стандарди*;
- *Ревизии и квалификација на договорни истражувачки организации (Contract Research Organizations – CRO)*.

II. Производ-специфична документација за PAI

Оваа документација е насочена кон специфични аспекти на производот и е задолжителна во рамки на инспекциите пред одобрување:

- *Аналитички извештаи за развој*: за активната супстанција и за готовиот производ;
- *Извештаи од истражување на отстапки и несогласувања*: за сомнителни резултати, OOS резултати и неусогласени серии;
- *Сертификати за анализа*: за сите токсиколошки и клинички серии;
- *Профили на серии*: поврзување на претклинички, клинички, регистрациони и валидациони серии (доколку се достапни);
- *Карактеризација на референтни стандарди*;
- *Извештаи за ажурирања за стабилност*: за активната супстанција и готовиот производ (за регистрација, клинички испитувања и токсиколошки цели);
- *Спецификации*: за клиничката и регистрационата фаза;
- *Валидација на методи*, вклучувајќи и научно образложение;
- *Валидација на чистење на опремите*.

III. Документација за трансфер на технологија

Документацијата за трансфер на технологија претставува еден од клучните сетови записи што се разгледуваат за време на GMP инспекции. Со неа се евидентира преносот на аналитичка одговорност од една локација или организациска единица до друга. Најчесто тоа подразбира трансфер од аналитичкиот истражувачко-развоен тим кон одделот за контрола на квалитет на производната локација.

Дополнителни трансфери може да се појават како резултат на организациски реструктурирања или промени во стратегијата за снабдување. Клучно е со трансферот да се пренесат и историјата на развојот, како и релевантното научно и техничко знаење поврзано со методите и процесите.

Оваа документација обезбедува континуитет, следливост и усогласеност со GMP барањата при преминот на аналитичките активности од една организациона целина во друга.

IV. Аналитички извештај за развој

Аналитичкиот извештај за развој претставува детален запис за еволуцијата на аналитичките методи применети при развој на нова активна супстанција и на готовиот производ. За секој од нив се подготвува посебен извештај.

Клучни елементи на извештајот се:

- хронолошка следливост на спецификациите;
- евиденција за сите значајни ревизии на тестовите, методите и критериумите;
- детален развој на клучни методи за: идентификација, содржина, онечистувања, перформанси (како, на пример, големина на честиси, растворливост);
- резиме на методите со образложение за изборот, причините за направените измени и демонстрација на еквивалентност или супериорност на финалните методи.

На крајот, извештајот треба да го поврзе аналитичкиот развој со логично утврдените критериуми за квалитет и со контролите на активната супстанција и готовиот производ. Оваа структура обезбедува систематски преглед на развојниот процес и ја поддржува научната и регулаторна валидност на избраните методи и спецификации.

Профили кои континуирано мора да се следат се:

- *Профил на онечистувања* – мора постојано да се мониторира и контролира од серија до серија, особено по промени во производствениот процес или формулацијата. Значајни промени можат да ја компромитираат валидноста на веќе спроведени претклинички и клинички испитувања;

- *Профил на растворливост* – доколку се забележат значителни промени, може да биде потребна студија за биоеквивалентност, со цел да се потврди дека новата дозирана форма е еквивалентна на претходната.

Профилите на онечистувања и растворливост мора да бидат конзистентни низ целиот развоен процес. Доколку се забележат значајни разлики, може да биде потребно спроведување дополнителни претклинички или клинички студии за оправдување на таквите отстапувања.

Иако аналитичкиот извештај за развој не претставува формален дел од регулаторната апликација, тој има клучна интерна функција. Служи како:

- референтен документ при инспекции од здравствените власти;
- поддршка при трансфер на технологии меѓу оддели или производствени локации;
- ретроспективен преглед на методите користени во лабораторијата за контрола на квалитет по пуштањето на производот на пазарот.

Извештајот треба да обезбеди:

- детален преглед на податоците собрани за време на развојот;
- документација за сите успешни и неуспешни експерименти што довеле до конечните аналитички протоколи;
- образложение за направените методолошки промени;
- критични проценки и заклучоци;
- целосни референци (претходни истражувачки извештаи, научни публикации, патенти, лабораториски белешки и друг релевантен изворен материјал).

V. Преглед на аналитичка документација од страна на QA

Тимот за обезбедување квалитет (Quality Assurance – QA) има централна улога во осигурувањето дека аналитичката документација е усогласена со важечките регулаторни стандарди. Неговата примарна одговорност е да верификува дека сите податоци се точни, целосни и валидни и дека се усогласени со принципите на тековната добра производствена практика (cGMP) и добрата лабораториска практика (GLP).

Обемот на преглед, ревизија и/или одобрување од страна на QA може да варира во зависност од организациската структура и политиката на компанијата. Сепак, независно од интерните практики, вклучувањето на QA тимот во раните фази на развој и подготовка на документи станува сè почеста практика (ICH Q8(R2), 2005). Ова произлегува од зголемената свест за значењето на регулаторната усогласеност и постојаното заострување на барањата од здравствените власти за контрола на клинички и формулации наменети за пазарот.

Во тој контекст се идентификуваат документи што бараат експлицитен преглед и одобрување од страна на QA единицата. Тие претставуваат клучни елементи во демонстрирањето усогласеност со релевантните прописи и се предмет на детална проверка при инспекции. QA единицата има обврска да обезбеди нивна усогласеност со важечките регулативи и со внатрешните стандарди за квалитет.

– *Документи што задолжително бараат одобрување од QA единицата:*

- сертификати за анализа;
- извештаи од истражувања (на пример, OOS резултати);
- стандардни оперативни процедури;
- документација за контрола на аналитички промени;
- протоколи и извештаи за трансфер на технологија;
- протоколи и извештаи за валидација на софтвер (вклучувајќи LIMS и системи за собирање податоци).

- *Документи што, вообичаено, се прегледуваат или ревидираат, но не мора формално да бидат одобрени од QA единицата:*
 - спецификации и аналитички методи;
 - протоколи и извештаи за валидација на методи;
 - извештаи за стабилност;
 - извештаи за карактеризација на супстанцијата или производот;
 - записи од лабораториски испитувања;
 - документација за квалификација и валидација на аналитички инструменти;
 - лабораториски дневници.

Прегледот на овие документи од страна на QA единицата обезбедува дополнителна контрола на интегритетот на податоците и поддршка на усогласеноста со принципите на cGMP и GLP.

Во контекст на регулаторни инспекции, активниот надзор и учество на QA единицата во процесот на подготовка и преглед на аналитичката документација значително го олеснува процесот на одговарање прашања поставени од здравствените власти и придонесува за поповолен исход од инспекцијата.

VI. Тим за подготовка за инспекција пред одобрување

Инспекциите пред одобрување (Pre-Approval Inspections – PAI) претставуваат клучен дел од процесот на оценка на квалитетот на фармацевтските производи пред нивното пуштање во промет. За таа цел во рамките на компанијата се формира тим за PAI, чија задача е да обезбеди навремена и темелна подготвеност за регулаторна инспекција, со фокус на усогласеност со принципите на cGMP и системот за квалитет.

Тимовите за PAI, најчесто, се формираат до 18 месеци пред поднесување на апликацијата за нов лек. Тие се интердисциплинарни и, вообичаено, се составени од претставници на тимовите за: истражување и развој, контрола на квалитет, регулаторни прашања и производство. Нивната основна цел е проактивна проценка на ризиците поврзани со квалитетот и одобрувањето на новиот производ, како и подготовка на релевантната документација за инспекција.

Во соработка со проектниот тим, тимот за PAI подготвува планови за да обезбеди:

- развој и поддршка на документација во согласност со регулаторните барања;
- навремено откривање и адресирање на потенцијални слабости;
- успешно одобрување на производот од страна на здравствените власти.

Тимот за QA, заедно со аналитичките експерти во тимот за PAI, има задача да изврши ревизија на следната документација:

- документација за делот за квалитет на производот од досието за регистрација (хемија, производство и контрола) и придружни податоци (по можност пред официјалното поднесување);
- лабораториски дневници и сертификати за анализа (за референтни стандарди, клинички серии и серии за регистрација);
- ажурирани извештаи за стабилност на активната супстанција и готовиот производ;
- извештаи за трансфер на технологија (како за активната супстанција, така и за готовиот производ);
- спецификации и валидирани аналитички методи, вклучувајќи и суровини и материјали за пакување;
- достапни аналитички податоци и извештаи;
- лабораториски истражувања и извештаи од истражувања (на пример, за OOS резултати);
- документација за валидација на постапките на чистење.

Тимот за PAI треба да изготви специфична листа за проверка на секој производ со цел да се идентификуваат сите релевантни аспекти што ќе бидат предмет на регулаторна ревизија.

Формирањето ваков тим претставува најдобра практика во управувањето со квалитетот и ја зголемува веројатноста за поволен исход при инспекциите. Преку интердисциплинарен пристап тимот за PAI обезбедува доследност на документацијата, верификација на усогласеноста со аналитичките и производните податоци, како и превентивна идентификација на потенцијални регулаторни проблеми.

Овој пристап овозможува организацијата да биде проактивна наместо реактивна, со што се минимизираат ризиците од одбивање на апликацијата за регистрација и се забрзува процесот на добивање одобрение за пуштање на лекот во промет.

5.4. Истражувачки документи во фармацевтскиот развој

Истражувачките документи претставуваат суштински елемент на системот за квалитет во рамките на истражувањето и развојот на фармацевтски производи. Тие служат како официјален запис за клучните откритија, одлуки и промени што настануваат во текот на животниот циклус на еден производ: од фазата на рано откривање, преку претклинички и клинички развој, па сè до регистрацијата и пуштањето во промет.

Иако, вообичаено, вниманието се насочува кон успешните истражувачки активности, и искуствата од неуспешни студии или прекинати развојни програми имаат значајна вредност. За жал, ваквите извештаи ретко се подготвуваат и архивираат, што претставува пропуштена можност за учење. Историјата во истражувачкиот и развојниот процес често се повторува, што значи дека исти грешки, предизвици или ограничувања можат повторно да се појават во идни проекти. Затоа, систематското евидентирање и анализа на неуспешни обиди може да придонесе за подобро донесување одлуки, рационално користење на ресурсите и оптимизирање на стратегиите во следните развојни фази. Сепак, имајќи го предвид времето и напорот потребни за подготовка на вакви извештаи, секогаш треба свесно да се процени дали нивната корист ги оправдува вложените ресурси.

Истражувачките извештаи имаат клучна улога во документираното следење на сите значајни научни и технички настани поврзани со развојот на нов фармацевтски производ, особено во раните фази. Иако тогаш сè уште не се бара формална регулаторна документација, подготовката на вакви извештаи станува сè поважна поради новите регулаторни барања воведени од FDA.

Во последниве години FDA вовеле водичи со кои се поедноставува обемот на документацијата што мора да се обезбеди во рамките на поднесоците за истражување нов лек. Овие упатства овозможуваат вклучување кратки резимеа наместо обемни технички податоци, особено во делот за хемија, производство и контрола (Chemistry, Manufacturing and Controls – CMC). Иако ваквиот пристап го забрзува процесот, тој истовремено ја нагласува потребата од робусна интерна документација, особено за клиничките фази 1 и 2. Оваа документација, освен што служи како внатрешна основа за одлуки, истовремено обезбедува и заштита во случај на ревизија или ретроспективна анализа.

Иако може да се создаде впечаток дека регулаторните барања за документација се намалени, во суштина станува збор за прераспределба, а не за реално намалување. Наместо деталните технички податоци да бидат составен дел од регулаторните поднесоци, тие мора да се чуваат во интерните архиви на компанијата (EDQM, 2022c). На тој начин сè поголема одговорност за создавање, чување и управување со обемна техничка документација се префрла врз фармацевтските компании. Конкретно, тие треба да обезбедат:

- точна, целосна и проверлива евиденција за сите истражувања и развојни активности;
- континуирана поддршка за податоците вклучени во регулаторните резимеа;
- подготвеност да ги презентираат или поднесат овие документи при регулаторна ревизија или инспекција.

Овој премин бара воспоставување силни системи за интерна документација, со јасно дефинирани процедури за подготовка, преглед, архивирање и следење на истражувачките извештаи (EDQM, 2022c). Така, и покрај формалното намалување на документацијата во регулаторните досиеја, вкупното оптоварување со документација реално не е намалено, туку е прераспределено во рамките на организацијата.

Во процесот на истражување и развој на фармацевтски производ се создаваат различни видови истражувачки документи кои претставуваат основа за научна евиденција, поддршка на развојните одлуки и подготовка на идни регулаторни поднесоци. Најзначајните категории се следниве:

- *Извештаи за предформулирање*, кои содржат податоци за физичко-хемиските својства на активната супстанција (растворливост, стабилност, хигроскопност, рКа итн.), кои имаат критично влијание врз изборот на соодветна фармацевтска форма и формулација;
- *Аналитички профили*, кои вклучуваат податоци за аналитичките методи развиени во истражувачката фаза (идентификација, чистота, концентрација, онечистувања, физичко-хемиски својства). Тие претставуваат основа за валидирани методи во подоцнежните фази на развој;
- *Документација за специјална технологија*, која се подготвува при користење напредни технологии, како нанотехнологија, липозомални системи, инјекциски депо-формулации или други иновативни системи за испорака на лековите. Овие документи ги опишуваат технолошките принципи, процесите и потенцијалните ризици;
- *Евалуации на експериментални, прототипни формулации*, кои прикажуваат резултати од тестирања на различни формулации во раната развојна фаза: споредбени студии, физичка стабилност, биорасположливост, компатибилност на компоненти и прелиминарни фармакокинетски резултати;
- *Извештаи за клучни одлуки во развојот и предлог-документи за управување*, кои содржат резимираны научни резултати, финансиски анализи и препораки за клучни одлуки: избор на финален произведен кандидат, прекин на проектот, промена на формулацијата или технологијата;
- *Истражувачки извештаи со критични податоци за регулаторни потреби*, што опфаќаат клучни резултати (профили на онечистувања, валидација на методи, податоци за стабилност), кои претставуваат основа за подготовка на досието за регистрација. Дури и кога не се директно вклучени во поднесокот, тие служат како поткрепа за веродостојноста на доставените податоци.

6. ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ НА ЦВРСТИ ДОЗИРАНИ ФОРМИ

Цврстите орални дозирани форми претставуваат најчесто користена форма за испорака на лекови поради нивната висока стабилност, едноставно производство и погодност за самостојна примена од страна на пациентот. Тие се широко прифатени и се сметаат за најсигурна и најпрактична форма на лекување. Во оваа група спаѓаат:

- форми со брзо ослободување на активната супстанција;
- форми со контролирано ослободување на активната супстанција;
- форми со продолжено ослободување на активната супстанција.

Дизајнот на ефикасни системи за испорака на лекови бара длабоко познавање на карактеристиките и однесувањето на активната супстанција за фармацевтска употреба (API), особено кога таа е инкорпорирана во полимерни матрикси, со цел модификација на нејзината физичка состојба и контрола на брзината и местото на ослободување (Rajabi-Siahboomi et al., 1996). Цврстите дозирани форми се развиваат така што ослободувањето на лекот се усогласува со физиолошките механизми на гастроинтестиналниот тракт, со што се обезбедува оптимална апсорпција и терапевтска ефикасност.

Формулациите со модифицирано ослободување претставуваат значаен технолошки предизвик за фармацевтските хемичари, бидејќи бараат прецизна контрола врз физичко-хемиските својства на активната супстанција и нејзината интеракција со помошните супстанции. За успешен дизајн на вакви системи од суштинско значење е јасното разбирање на физичката состојба на активната супстанција во рамките на дозираната форма.

Аналитичките тестови кои ја потврдуваат физичката форма на активната супстанција за фармацевтска употреба во рамките на дозираниот облик обезбедуваат подлабоко разбирање и подобра контрола на перформансите на производот, како и повисока сигурност во неговата конзистентност и квалитет.

Еден од клучните аспекти е примената на неструктивни и неинвазивни *in situ* техники, кои овозможуваат испитување без нарушување на структурата на дозираниот облик. Овие техники се особено корисни при развојот на формулации со брзо, контролирано или продолжено ослободување на активната супстанција. Преку ваквите техники се добива увид во физичката природа и микрохомогеноста на дозираниот облик, што е од суштинско значење за разбирање на факторите кои влијаат врз неговите перформанси и стабилност. Главни аналитички техники кои се применуваат за оваа цел се:

- Светлосна микроскопија;
- Поларизирана светлосна микроскопија (PLM);
- Скенирачка електронска микроскопија (SEM);
- Трансмисиона електронска микроскопија (TEM);
- Инфрацрвена микроспектроскопија со Фуриеова трансформација (FTIR);
- Нуклеарна магнетна резонанца (NMR);
- Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија;
- Раманова спектроскопија.

Овие техники се суштински за напредокот во развојот и за подобра предвидување на *in vitro* и *in vivo* однесувањето на цврстите дозирани форми. Во Табела 16. е прикажана нивна споредба во однос на принципот на работа, предностите и ограничувањата при карактеризација на активните супстанции за фармацевтска употреба.

Табела 16. Споредба на аналитички техники за карактеризација на API (автор)

Техника	Принцип на работа	Предности	Ограничувања
Светлосна микроскопија	Визуелизација со видлива светлина	Брза, едноставна, обезбедува основен увид во морфологијата	Ограничена резолуција, не обезбедува хемиски информации
Поларизирана светлосна микроскопија (PLM)	Оптичка анализа базирана на двојно прекршување	Детектира кристални/аморфни фази, структурни разлики	Не секој материјал е оптички активен
Скенирачка електронска микроскопија (SEM)	Сликање со електронски сноп	Висока резолуција, детална површинска морфологија	Бара вакуум, не обезбедува хемиски состав
Трансмисиона електронска микроскопија (TEM)	Пренос на електрони низ ултратенки примероци	Многу висока резолуција, анализа на внатрешна структура	Комплексна подготовка, висока цена, може да биде деструктивна
Инфрацрвена микроспектроскопија со Фуриеова трансформација (FTIR)	Апсорпција на инфрацрвена светлина во молекули	Хемиска идентификација, квалитативна анализа	Ограничена просторна резолуција, интерпретацијата е сложена
Нуклеарна магнетна резонанца (NMR)	Магнетни својства на атомските јадра	Обезбедува информации за молекуларна подреденост и интеракции	Висока цена, бара големи количини материјал
Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија	Апсорпција на блиска инфрацрвена светлина	Брзина, неинвазивност, погодна за процесна контрола	Пониска селективност и чувствителност
Раманова спектроскопија	Расејување на светлина предизвикано од молекуларни вибрации	Висока хемиска селективност, без потреба од подготовка	Чувствителна на флуоресценција, потребен е темен матрикс

Вториот фокус во ова поглавје се high-throughput техниките, прикажани во Табела 17., кои овозможуваат брза и ефикасна проценка на квалитетот на фармацевтските производи. Меѓу нив спаѓаат:

- Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија;
- Фиброоптичко следење на растворливоста;
- Проточна инјекциска анализа (Flow Injection Analysis – FIA);
- Роботизирани системи за ракување со примероци.

Овие техники овозможуваат автоматизација, зголемување на моќта на пропустливост и значително намалување на времето потребно за анализа, без компромис во однос на прецизноста и репродуктивноста на резултатите. Нивната примена не само што ја подобрува ефикасноста на аналитичките лаборатории туку и овозможува аналитичарите да го насочат своето време кон решавање комплексни

проблеми, развој на нови методи и поинтензивна комуникација со различни оддели и корисници на лабораториските услуги.

Табела 17. High-throughput техники во фармацевтските анализи (автор)

Техника	Примена	Предности	Ограничувања
Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија	Квантитативна и квалитативна анализа на активна и помошни супстанции	Брза, недеструктивна, без подготовка на примерок, погодна за <i>in line</i> контрола	Помала чувствителност за супстанции во ниска концентрација
Фибер-оптичко следење на растворливост	Континуирано следење на профилот на растворливост на лекот	Во реално време, без потреба од вадење на примероци, автоматизирано	Потребна калибрација, чувствително на заматеност на медиумот
Проточна инјекциска анализа (FIA)	Брза анализа на течни примероци преку инјектирање во проточен систем	Висока брзина, ниска потрошувачка на реагенси, погодна за сериски анализи	Ограничена примена кај нестабилни соединенија, може да бара посебни детектори
Роботизирани системи за ракување со примероци	Автоматизирано земање, подготвување и инјектирање на примероци	Висока моќ на пропустливост, намалена можност за грешка од операторот, висока репродуктивност	Високи иницијални трошоци, бара одржување и софтверска поддршка

Техниките што вклучуваат ситнење, растворање или екстракција на активната супстанција од дозираната форма често резултираат со губење критични информации за физичките својства на примерокот (Kelly et al., 1998). Како резултат на тоа тие не обезбедуваат доволно релевантни податоци за физичките својства и перформансите на самата дозирана форма. Затоа техниките што бараат деструктивна подготовка на примерокот, како, на пример, хроматографијата, не се во фокус на ова поглавје.

Иако HPLC претставува доминантна техника за квалитативно и квантитативно определување на активни супстанции и онечистувања, таа не овозможува увид во физичката структура и микроскопската распределба на активната супстанција во рамките на дозираната форма. Во последните години се развиваат нови хроматографски техники, како, на пример, капиларна електрофореза, капиларна електрохроматографија и мицеларна електрокинетичка хроматографија (Altria et al., 1995; Weston & Brown, 1997; Kelly et al., 1998). Овие техники покажуваат значителен потенцијал за анализа на цврсти дозирани форми, но нивната примена сè уште е ограничена.

Капиларните техники нудат висока ефикасност на раздвојување, но се соочуваат со предизвици како непрецизност при инјектирање, варијации во електроосмотскиот проток, разлики во вискозитетот и ограничен капацитет на примерок. Сепак, интересот за нивната примена постојано расте, особено како алтернатива на HPLC, а неодамна се објавени и повеќе прегледи што ја опишуваат нивната улога во анализа на дозираните форми (Altria & Bestford, 1996).

6.1. Влијание на регулативата и улогата на ICH

Цврстите орални дозирани форми беа првите фармацевтски производи опфатени со глобалната регулаторна хармонизација преку ICH. Ова тело претставува заедничка иницијатива на фармацевтската индустрија и регулаторните тела во САД, ЕУ и Јапонија, со цел изедначување на барањата и стандардите за квалитет.

Одделот за квалитет во рамките на ICH ги насочи своите напори кон развој на упатства за: валидација на аналитички методи, стабилност на лековите, како и спецификации за онечистувања и резидуални растворувачи. Овие документи се важни референтни извори за развој на аналитички методологии и нивна регулаторна прифатливост.

Особено значајно е воведувањето на ICH Q6A водичот и придружните протоколи за одлучување, кои овозможува појасно дефинирање на критериумите за перформанси и спецификации на активните супстанции и готовите производи. Со тоа се обезбедува стабилност, ефикасност и предвидливост на производот во текот на целиот рок на употреба.

Во оваа насока современите аналитички практики сè повеќе се потпираат на неинвазивни и недеструктивни *in situ* тестови за потврдување на физичката состојба на активната супстанција во рамките на дозираната форма. Таквите тестови придонесуваат за подлабоко разбирање на перформансите на производот и дополнително ја засилуваат неговата регулаторна усогласеност.

6.2. Улогата на аналитичките научници во развојот на нови лекови

Низ целиот процес на развој на лекови аналитичките научници имаат суштинска мултидисциплинарна улога. Податоците што тие ги генерираат претставуваат основа за кредибилитетот на регулаторните поднесоци и се клучна компонента во делот за хемија, производство и контрола (СМС). Досието за СМС е составен дел од техничката документација што се поднесува до регулаторните тела (како, на пример, FDA и EMA) и служи за да покаже дека производот е безбеден, ефикасен и произведен на репродуктивен начин.

Аналитичките научници даваат поддршка во различни фази на развој, вклучувајќи: развој на нови јачини на веќе одобрен лек (на пример, за проширување на производната линија), промена на пакувањето или промена на добавувач или извор на суровини. Во одредени случаи аналитичкиот тим е единствено одговорен за проценката на влијанието на овие промени врз квалитетот на производот. Иако водичот на FDA за зголемување на обемот на производство и промени по одобрување (Scale-Up and Post-Approval Changes – SUPAC) предвидува поедноставни пристапи за модификации, потребата од аналитичка документација и поткрепа не е исклучена.

Во раните фази од развојот аналитичките научници се вклучени во активности како што се: поддршка на синтезата и откривањето активни супстанции, карактеризација на онечистувања и деградациски продукти, разјаснување на механизми на реакции, одредување физичко-хемиски константи, студии за компатибилност помеѓу активната и помошните супстанции, анализа на производи од конкурентни компании, студии за стабилност и тестирање на ослободување на активна супстанција.

Во подоцнежните фази нивната улога се проширува и опфаќа: развој и валидација на методи за тестирање, учество во валидација на процеси и чистење на опрема, обезбедување поддршка при трансфер на технологии и аналитички методи, како и следење на стабилноста на производите на пазарот.

Понатаму, аналитичката поддршка е од суштинско значење, како при развој на производната технологија, така и при обезбедување патентна заштита, преку генерирање релевантни научни податоци и докази за уникатноста на формулацијата или процесот.

6.3. Тестови и спецификации

Со развојот на современите аналитички лаборатории првичниот фокус бил ставен на тестови за потврдување на идентитетот, чистотата и јачината на активната супстанција, како и на готовиот производ. Во втората половина на дваесеттиот век дополнително се воведени тестови и спецификации за физичко-механички својства, како што се: тврдост (отпорност на кршење), распадливост (време на распаѓање на таблетата или капсулата) и растворливост (брзина и степен на ослободување на активната супстанција од дозираната форма). Целта на овие тестови е да се обезбеди конзистентна биолошка ефикасност и сигурни перформанси на лекот при секоја употреба.

Многу од принципите што порано беа теоретски предложени, како, на пример, концептот на ефективна специфичност (способност на методот да ги мери релевантните супстанции без пречки), денес широко се прифатени и применети во рутинските аналитички практики. Воведувањето на ICH Q6A водичот придонесе за значително поедноставување при воспоставувањето спецификации, особено преку:

- разјаснување дека онечистувањата кои веќе се контролираат на ниво на активна супстанција не мора задолжително да се контролираат и во готовиот производ, освен ако не претставуваат деградациски продукти;
- поттикнување на користење на поедноставни но софистицирани аналитички методи за тестирање при пуштање на лекот во промет, со минимална подготовка на примерокот.

Овие пристапи го отворија патот за поширока примена и усовршување на спектроскопските техники, како што се: UV-Vis спектроскопијата, проточната инјекциска анализа (FIA) и анализата на блискиот инфрацрвен спектар (NIR). На овој начин се овозможува зголемена примена на брзи, неинвазивни и високо прецизни техники во рутинската контрола на квалитет, со што се подобрува ефикасноста и се намалува времето потребно за анализа.

Во текот на развојот на цврстите орални дозирани форми се спроведуваат различни тестови за обезбедување соодветен квалитет, безбедност и ефикасност на производот. Типичните тестови, вклучувајќи ја и нивната вообичаена примена, се прикажани во Табела 18. Примената на овие тестови може значително да варира во зависност од регулаторните барања во земјата или регионот каде што лекот се пласира. Резултатите од овие тестови, како и нивното потенцијално влијание врз перформансите на производот, овозможуваат идентификација на критичните тестови – оние што мора да бидат вклучени во конечните спецификации.

Вообичаено, во групата критични тестови се вбројуваат:

- Идентитет на активната супстанција;
- Определување на содржината (јачината) на активната супстанција;
- Воедначеност на содржината;
- Распадливост или растворливост;
- Деградациски продукти (онечистувања);
- Визуелна проверка (изглед, боја, оштетувања).

Тестот за идентитет има особено значење, бидејќи потврдува дека точната активна супстанција е присутна во производот. Најчесто, при изведба на овој тест, се применуваат два комплементарни пристапа:

- спектроскопски метод (на пример, FTIR), кој обезбедува специфичен „отпечаток од прст“ на супстанцијата чијшто идентитет се потврдува;
- хроматографски метод (на пример, HPLC), базиран на времето на задржување, со цел разликување на активната од сродните супстанции или можните форми на соли.

Овие тестови мора да бидат доволно специфични за да овозможат разликување на активната супстанција од другите компоненти во матриксот на дозираната форма. Дополнително, кога терапевтската ефикасност е поврзана со специфична полиморфна (кристална) форма или стереоизомер на активната супстанција, неопходно е вклучување на тест за идентитет кој е селективен токму за овие својства.

Тестовите за содржина и воедначеност на содржина претставуваат значително оптоварување за лабораториските ресурси, особено во фазите на развој и пуштање на лекот во промет. Иако тие обезбедуваат корисен увид во квалитетот на поединечната серија, нивната способност да дадат информации за очекуваните перформанси на производот во реални услови е ограничена. Вообичаено се изведуваат врз мал број

примероци, најчесто 30 таблети или помалку, кои треба да ја претставуваат целата серија што може да брои и над 100 000 единици.

HPLC е најчесто применувана техника за определување содржина и воедначеност на содржина, особено кога е потребен stability-indicating метод (метод што може да следи и/или раздвојува потенцијални деградациски продукти) (Adamovics, 1996). Квантификацијата на овие соединенија е од суштинско значење за обезбедување на квалитетот на готовите производи, бидејќи нивното присуство може да укаже на проблеми во производниот процес, несоодветни материјали за пакување или неправилни услови за складирање. Некои деградациски продукти може да бидат токсични, па нивната навремена идентификација е клучна за безбедноста на пациентите.

Затоа аналитичките методите мора да бидат способни да ги детектираат веќе познатите соединенија, но и да имаат потенцијал за откривање нови, досега неидентификувани деградациски продукти. Во таа насока HPLC се смета за метод од избор. Иако располага со помал број теоретски подови во споредба со гасната хроматографија, таа обезбедува соодветна резолуција за раздвојување на активната супстанција од сродните и помошните супстанции, дури и при ниски концентрации, под услов активната супстанција да поседува соодветен хромофор.

Тестовите за распадливост и растворливост претставуваат едни од најважните методологии за оценка на перформансите на дозирани форми. Иако овие методи, развиени пред околу 25 години и стандардизирани во фармакопеите, бараат значителен човечки ангажман, токму тоа ги прави особено погодни за модернизација и автоматизација. Тестот за растворливост е широко прифатен како клучен метод за контрола на квалитетот со цел обезбедување конзистентност во производството. Во поново време неговата улога се прошири и денес сè повеќе се користи како алатка за предвидување на биорасположливоста.

Денес дизајнот на тестовите за растворливост сè повеќе се насочува кон воспоставување на *in vitro* - *in vivo* корелација (IVIVC), која е од особено значење за докажување на биеквивалентност. Во таа насока USP опишува најмалку седум типови апарати за одредување на степенот на ослободување на активната супстанција од дозираната форма. Најчесто применувани се апарат 1 (корпи), апарат 2 (весла) и апарат 4 (проточна ќелија), така што последниот бележи сè поголема примена во поново време. Иако фармакопеите пропишуваат општи параметри (како, на пример, состав, волумен на медиум за растворање, брзина на мешање и температура), изборот на соодветните услови треба да се заснова на способноста на методот да детектира варијации кај производот, чувствителност кон факторите на стабилност и полиморфизам, како и потенцијалот за воспоставување IVIVC.

HPLC останува техника од избор и за анализа на производи што содржат повеќе активни супстанции, обезбедувајќи висока линеарност, специфичност и прецизност. Сепак, таа е релативно бавна, секвенцијална техника, што бара значителен капацитет за складирање податоци и ригорозна верификација на соодветноста на системот.

Во повеќе случаи на пазарот се појавиле навидум еквивалентни лекови кај кои, и покрај идентичната содржина на активната супстанција и сличноста во дозираната форма, се забележани значителни разлики во *in vitro* и *in vivo* перформансите. Овие несогласувања ја нагласија потребата од развој на IVIVC. Во последната деценија овој концепт добива сè поголемо внимание: новите регулаторни упатства (на пример, за дозирани форми со продолжено ослободување) дозволуваат користење на кој било тест за растворливост за воспоставување IVIVC. Дополнително, овој напредок е поддржан на меѓународни работилници во кои учествувале индустриски, академски и регулаторни претставници.

IVIVC се смета за неопходен дел од апликациите за нови, генерички лекови и модифицирани дозирани форми. Иако неговото воспоставување бара тесна соработка меѓу аналитичките, фармацевтските и биофармацевтските тимови, придобивките што ги носи се големи. На пример, кај промени опфатени со SUPAC, како што се формулацијата, производството, опремата или местото на производство, воспоставен

IVIVC може да ги замени скапите и долготрајни студии за биоеквивалентност, доколку резултатите од тестот за растворливост покажат еквивалентност. Во такви случаи, IVIVC е главен фактор при воспоставување на спецификациите за растворливост.

Тестот за визуелна проверка има значајна улога како кај лекови во големо пакување (bulk) така и кај финално пакувани производи. Со него може да се открие влошување на квалитетот предизвикано од несоодветни услови на складирање или, пак, од интеракција со материјалите за пакување. Иако цврстите орални дозирани форми се, генерално, помалку чувствителни на условите на пакување во споредба со течните или полуцврстите препарати, сепак се забележани несакани појави, како, на пример, обезбојување на таблети предизвикано од траги од белила што останале при обработка на памучниот материјал користен во пакувањето.

Конечно, спецификациите треба да ги земат предвид очекуваните перформанси на дозираната форма, како што се:

- *брзина на растворливост*: кај таблети со моментално ослободување лекот треба да се раствори за неколку минути, а не за 45 минути или повеќе;
- *профил на ослободување*: кај производи со контролирано ослободување лекот мора да се ослободи според однапред дефиниран профил;
- *физичка форма на активната супстанција*: неопходно е да се потврди дека активната супстанција е присутна во очекуваната полиморфна (кристална) форма во рамките на готовиот производ, бидејќи тоа директно влијае врз неговите перформанси.

Табела 18. Типични тестови за цврсти орални дозирани форми и нивна примена (автор)

Тест	Цел на тестот	Фаза на примена
Идентитет	Потврда на присуството на активната супстанција	Развој, регистрација, контрола на квалитет
Содржина (јачина)	Квантификација на количината на активна супстанција во примерок	Развој, валидација, контрола на квалитет
Воедначеност на содржина	Оценка на конзистентноста на дозата меѓу поединечни единици	Контрола на квалитет, сериска проверка
Распадливост	Одредување на времето потребно за распаѓање на дозираната форма	Ран развој, контрола на квалитет
Растворливост	Проценка на профилот на ослободување на активната супстанција	Развој, регистрација, сериска проверка
Деградациски продукти	Детекција на деградациски продукти	Развој, студии за стабилност, регистрација
Визуелна проверка	Оценка на изгледот, бојата и евентуални оштетувања	Контрола на квалитет
Полиморфна форма*	Потврда на специфична кристална форма доколку е критична	Развој, регистрација
Стереохемиска карактеризација*	Разликување и потврда на специфичен стереоизомер	Развој, регистрација

*Овие тестови се применуваат само кога полиморфизмот или стереохемијата се критични за ефикасноста на лекот.

6.4. Техники за физичко-хемиска карактеризација

Техниките за физичко-хемиска карактеризација играат сè поважна улога во развојот на лекови бидејќи овозможуваат подлабоко разбирање на механизмите на ослободување и испорака на активната супстанција. Регулаторните агенции очекуваат ова знаење да биде демонстрирано како дел од извештајот за фармацевтски развој, каде што физичко-хемиската карактеризација претставува клучна компонента.

Иако растворливоста е прв чекор во ослободувањето на активната супстанција од цврстата орална дозирана форма, *in vitro* определувањето на профилите на ослободување обезбедува само ограничени информации за точниот механизам на овој процес. За покомплетна слика неопходна е проценка на внатрешната структура на дозираниот облик, микрохомогеноста и морфологијата на активната супстанција, како и распределбата на компонентите во матриксот. За таа цел потребно е да се применат напредни аналитички техники, меѓу кои најчесто се користат:

- Микроскопија (вклучувајќи електронска и поларизирана);
- Енергетски-дисперзивна рендгенска спектроскопија (EDX/EDS);
- Рендгенска дифракција на прашок (XRPD): за анализа на кристалност и полиморфизам;
- Термичка анализа (DSC, TGA): за проценка на термичка стабилност и фазна состојба на активната супстанција;
- FTIR микроспектроскопија: за локализација на функционални групи и идентификација на хемиски интеракции;
- NMR снимање (NMR imaging): за карактеризација на молекуларна мобилност и просторна распределба (Rajabi-Siahboomi et al., 1996);
- Масена спектрометрија (MS): за детекција и структурна анализа на компоненти;
- Раманова спектроскопија: за проценка на молекуларна структура и интеракции.

Комбинирањето и интерпретацијата на податоците од овие техники овозможуваат оптимизација на формулацијата, гарантирање на конзистентноста и квалитетот на производот, како и подобра контрола на неговата стабилност.

6.4.1. Микроскопија

Микроскопските техники – светлосна микроскопија, поларизирана микроскопија (PLM), скенирачка електронска микроскопија (SEM) и трансмисиона електронска микроскопија (TEM) – претставуваат недеструктивни методи за карактеризација на фармацевтски дозирани форми. Тие овозможуваат проценка на внатрешната структура на дозираната форма, увид во хомогеноста и распределбата на активната супстанција, како и анализа на потенцијални структурни неправилности. На овој начин микроскопските техники придонесуваат за разбирање и предвидување на клучни перформансни карактеристики, како што се: профил на растворливост, механичка стабилност, интегритет на облогата кај производи со контролирано ослободување (Mitchell & Palermo, 1999).

Пример: Анализа на гранулација

Комбинираната примена на PLM и EDX/EDS со SEM овозможува мапирање на активната супстанција во гранулацискиот матрикс. Со PLM на пресек од матриксот може да се визуелизираат кристалите на активната супстанција, што укажува на задржување на нејзината кристална структура. Елементната анализа со EDX/EDS, пак, овозможува потврда на присуството и распределбата на специфични елементи. На пример, мапирање на хлор кај активна супстанција во форма на хидрохлоридна сол, со што се демонстрира рамномерна распределена и стабилност на активната супстанција по изложување на високи температури и сушење.

Микроскопските техники овозможуваат директна и визуелна проценка на квалитетот и интегритетот на активната супстанција во готовиот производ. Нивната примена е клучна во развојот, оптимизацијата и контролата на фармацевтските дозирани форми, особено кога е неопходно да се обезбеди структурна хомогеност и стабилност на активната супстанција.

Неодамна е развиена и патентирана фаза на микрорастворливост која се применува во рамките на SEM и овозможува набљудување во реално време на процесот на растворање на поединечна честица, таблета или друг цврст материјал. На овој начин аналитичарот може да добие повторливи микрографски снимки од иста локација на примерокот, но во различни временски точки. SEM снимањето може да се врши во секундарен електронски режим и режим со обратно расејување, со што се добиваат морфолошки и топографски информации.

Пример: Анализа на пелети (сферични гранули)

Со примена на SEM во комбинација со патентираната фаза на микрорастворливост, беа испитувани пелети пред и по тестот за растворливост од еден час. Резултатите покажале дека по еден час кристалите на активната супстанција на површината се раствориле (видливи како црни празнини на микрографијата), додека пелетниот матрикс ниту се распаднал ниту се растворил. Ослободувањето на активната супстанција било речиси целосно, без структурни промени на дозираната форма. Овој пристап овозможува директно следење на процесот на ослободување на активната супстанција. Површинската морфологија и микротопографијата добиени со оваа техника даваат детален увид во механизмот на ослободување, што е од голема важност при развој и оптимизација на фармацевтските формулации.

6.4.2. Рендгенска дифракција на прашок (XRPD)

Во кристалните соединенија молекулите се организирани во тридимензионална структура позната како кристална решетка. Кога колимиран зрак од X-зраци ќе ја погоди оваа решетка, доаѓа до дифракција и се создава специфична дифракциска шема. Секоја кристална форма на соединението има своја карактеристична дифракциска шема, што ја прави XRPD моќна алатка за идентификација и карактеризација на цврсти форми.

Во фармацевтскиот развој XRPD се користи за:

- разликување на полиморфи, хидрати и солвати, како и за следење на фазни транзиции меѓу нив;
- карактеризација на промени во цврстата состојба на активната супстанција за време на формулацијата, како што се преминот од кристална во аморфна форма или процеси на хидратација и дехидратација;
- мониторирање на стабилноста на активната супстанција во тек на производниот процес.

Пример: Анализа на стабилноста на полиморфната форма

За да се провери дали полиморфната форма на активната супстанција останува непроменета за време на формулацијата, се применува XRPD анализа. Испитувањето опфаќа спрашени таблети од готовиот производ, спрашени плацебо таблети и три различни серии на активната супстанција.

Добиените дифракциски шеми покажуваат дека кристалната структура на активната супстанција останува стабилна и непроменета. Врвовите на дифракциските шеми од таблетите добро се совпаѓаат со оние на активната супстанција, особено во регионот со повисоки 2θ агли, каде што сигналите се поизразени и покарактеристични. Влијанието на плацебо таблетите врз резултатите е занемарливо, што укажува дека помошните супстанции не влијаат врз полиморфната форма на активната супстанција.

Малите разлики што се забележуваат во дифракциските шеми на активната супстанција се должат на преференцијална ориентација на кристалите, а не на вистински структурни промени. На тој начин се потврдува дека производниот процес не предизвикува полиморфни промени во активната супстанција.

6.4.3. Термални анализи

TG/DTA е корисна аналитичка техника за карактеризација на фармацевтски супстанции во цврста состојба. Таа се применува особено за:

- одредување на загубата на маса (на пример, при сушење);
- идентификација на фазни премини (ендотермни или егзотермни);
- проценка на термичката стабилност;
- разликување врзана и неврзана вода.

Оваа техника ги комбинира двата пристапа:

- *Термогравиметриска анализа (TG)*: мерење на промената на масата на примерокот при загревање;
- *Диференцијална термичка анализа (DTA)*: мерење на температурната разлика помеѓу примерокот и инертен референтен материјал.

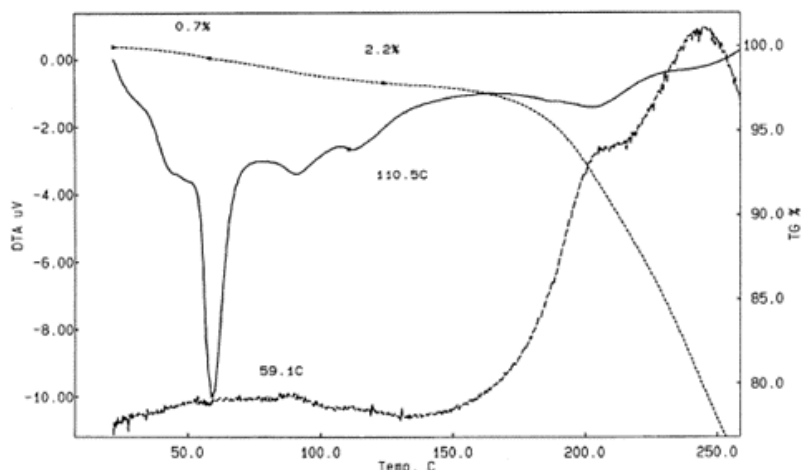
При ендотермни премини (како, на пример, топење, дехидрација) температурата на примерокот останува константна. Наспроти тоа, при егзотермни премини (како, на пример, кристализација), температурата на примерокот се зголемува. Истовремено, термогравиметриската крива прикажува колкава маса е изгубена на соодветната температура. Комбинацијата на податоците од TG и DTA овозможува многу појасна и посигурна интерпретација отколку кога секоја техника се користи поединечно.

Пример: Анализа на хидрирана активна супстанција со TG/DTA

TG/DTA се применува за испитување промени во кристалната структура и физичките трансформации на хидрирана активна супстанција во гранулат и таблети произведени од истиот гранулат.

Кај гранулатот DTA-термограмот покажува два ендотермни пика: на 71,5 °C, што се припишува на дехидрација на активната супстанција, и на 110,8 °C, што одговара на нејзино топење (Budavari, 1996). Дополнителните ендотермни пикови на 60,6 °C и на околу 100 °C се должат на други компоненти во матриксот.

Кај таблетите, пак, ендотермниот пик на 71 °C (дехидрација) отсуствува, што укажува на загуба на вода или структурна промена. Ендотермниот пик на топење на околу 110,5 °C е проширен, што може да се поврзе со промени во кристалната морфологија на активната супстанција по компресија.



Слика 18. Резултати од TG/DTA на таблета и хидрирана активна супстанција; Испрекинатата крива ја претставува TG анализа, која ја бележи загубата на маса; Непрекинатата крива ја претставува DTA; Со испрекинатата крива е означен и дериватот на TG анализа (Ahuja & Scypinski, 2001)

На Слика 18. се прикажани TG-термограмот (со испрекината линија), кој ја бележи загубата на маса и негов дериват, што овозможува попрецизна детекција на суптилни термички транзиции. Кај гранулатот се забележуваат два јасно изразени чекори на загуба на маса, што укажува на присуство на различни типови вода (на пример, површинска и врзана). Кај таблетата, пак, се регистрира континуирана загуба на вода од собна температура до околу 125 °C, што укажува на повеќе воедначен и постепен процес на деградација.

Техниката TG/DTA не само што обезбедува вредни информации за термичките својства и стабилноста на фармацевтските супстанции туку овозможува и следење на структурните промени за време на формулацијата. Во овој случај нејзината примена во анализа на таблети покажува дека при компресија дел од активната супстанција ја губи врзаната вода, што може да влијае врз кристалната структура. Податоците од XRPD дополнително потврдуваат дека за време на компресијата навистина настанува промена во кристалната форма на активната супстанција, односно премин од кристална во аморфна состојба. Аморфната форма често се одликува со зголемена растворливост, но истовремено и со поголема хемиска нестабилност, што може да резултира со побрза деградација на активната супстанција.

Овој пример ја нагласува важноста од внимателно следење на термичките и структурните својства на активната супстанција за време на сите етапи од производниот процес, како и од контрола на кристалната форма, бидејќи дури и микроскопски промени можат значително да влијаат врз стабилноста и ефикасноста на крајниот производ.

6.4.4. FTIR микроспектроскопија

Инфрацрвената микроспектроскопија со Фуриеова трансформација (FTIR) претставува аналитичка техника за карактеризација на хемискиот состав на материјали во цврста состојба со висока просторна резолуција. Таа комбинира инфрацрвена спектроскопија, која ги мери вибрационите премини на молекулите со оптичка микроскопија, која овозможува анализа на специфични микролокации во примерокот со резолуција до околу 10 μm . При минување на инфрацрвеното зрачење низ материјалот молекулите апсорбираат енергија на карактеристични бранови должини што одговараат на нивните внатрешни вибрации (на пример, истегнување на C=O, C-H, O-H и N-H врски) (March, 1992). Добиените апсорпциски максимуми се прикажуваат во FTIR спектар, кој служи како „молекуларен отпечаток“ за идентификација на соединенијата.

FTIR микроспектроскопијата е особено значајна во фармацевтскиот развој, бидејќи овозможува карактеризација на составот, хомогеноста и хемиските интеракции во дозираните форми. Таа најчесто се применува за:

- *Идентификација на активната супстанција во матриксот*: Спектралното мапирање овозможува откривање на присуството, распределбата и концентрацијата на активната супстанција во различни делови од таблетата или гранулатот. Преку споредба со референтни спектри лесно се разликуваат активната супстанција и ексципиенсите;
- *Следење на хемиски интеракции*: FTIR може да открие интеракции меѓу активната супстанција и ексципиенсите преку поместување или појава на нови карактеристични апсорпциски пикови во инфрацрвениот спектар. На пример, поместување на C=O пикот може да укажува на формирање водородна врска или комплекс;
- *Проценка на физичко-хемиски промени*: Техниката е чувствителна на трансформации на активната супстанција, како премин од кристална во аморфна форма, хидратација или дехидратација, солвација или формирање нови соли.

Пример: Анализа на активна супстанција во таблета пред и по компресија

При испитување на цврста дозирана форма што содржи хидрохлоридна сол на активната супстанција, FTIR микроспектроскопијата е применета за мапирање на активната супстанција во пресек од таблетата и за анализа на функционалните групи пред и по компресија.

Резултатите покажале дека спектрите на активната супстанција се присутни низ целиот матрикс, што укажува на хомогена распределба. Отсуството на нови инфрацрвени апсорпциски пикови потврдува дека не доаѓа до хемиска реакција помеѓу активната супстанција и ексципиенсите. Дополнително, спектрите на активната супстанција во таблетата биле идентични со оние на некомпресирани референтна супстанција, што потврдува дека компресијата не доведува до промени во нејзината хемиска структура.

Табела 19. Предности и ограничувања на FTIR микроспектроскопијата (автор)

Предности	Ограничувања
Недеструктивна и брза анализа	Не детектира лесно мали концентрации на активни супстанции
Мапирање на хемискиот состав на микрониво	Примероците треба да имаат рамна и транспарентна површина
Идентификација на интеракции и физичко-хемиски промени	Ограничена просторна резолуција споредено со SEM (~10 μm)

FTIR микроспектроскопијата претставува вредна аналитичка алатка во фармацевтскиот развој бидејќи овозможува:

- детална анализа на хемискиот состав на активната супстанција и ексципиенсите;
- прецизно мапирање на хомогеноста на нивната распределба во матриксот;
- проценка на интеракциите и на стабилноста на активната супстанција за време на технолошката обработка.

Во комбинација со други техники, како SEM, XRPD и TG/DTA, FTIR микроспектроскопијата има комплементарна улога и значително придонесува за целосно разбирање на физичко-хемиските својства на дозираниите форми.

6.4.5. Нуклеарно-магнетна резонантна (NMR) спектроскопија

NMR спектроскопијата е моќна аналитичка техника што овозможува детална структурна карактеризација на молекули на атомско ниво. Таа се заснова на својствата на одредени атомски јадра, вообичаено, ^1H и ^{13}C , кои поседуваат магнетен момент и спин. Кога се поставени во надворешно магнетно поле, овие јадра резонираат со специфични радиофреквентни бранови.

При изложување на радиофреквентно зрачење во силно магнетно поле, јадрата апсорбираат енергија и преминуваат во повисоко енергетско ниво. Со нивното враќање во пониско ниво тие емитуваат сигнал што се снима и обработува, при што се добива NMR спектар.

Во фармацевтскиот развој NMR спектроскопијата наоѓа широка примена во следниве области:

- I. *Структурна идентификација и проверка на чистота*
 - Обезбедува детални информации за молекуларната структура на активната супстанција;
 - Секој сигнал во спектарот одговара на специфичен атом, а неговата положба и интензитет даваат податоци за хемиската околина и степенот на чистота.
- II. *Следење на полиморфизам и аморфизација*
 - Solid-state NMR овозможува разликување на различни цврсти форми на активната супстанција, дури и кога XRPD дава слични дифракциски шеми;
 - Аморфните материјали се карактеризираат со пошироки и дифузни сигнали, за разлика од острите и јасни сигнали кај кристалните форми.
- III. *Проценка на интеракции меѓу активната супстанција и ексципиенсите*
 - Промените во хемиските поместувања укажуваат на можни молекуларни интеракции, како што се формирање комплекси, соли или водородни врски.

IV. Квантитативна анализа

- Површината под сигналите е пропорционална со бројот на атоми, што овозможува прецизна квантитативна проценка на составот, особено во комплексни смеси.

Табела 20. Видови NMR спектроскопија во фармацевтската анализа (автор)

Вид на NMR спектроскопија	Примена
^1H NMR	Идентификација на протони и нивната хемиска околина
^{13}C NMR	Информации за јаглеродниот скелет на органските молекули
Solid-state NMR	Анализа на примероци во цврста состојба (активна супстанција, таблети, аморфни форми)
2D NMR (COSY, HSQC)	Комплексна структурна анализа: корелации меѓу различни атоми

Пример: Анализа на активна супстанција пред и по компресија

Во овој пример ^{13}C Solid-state NMR спектроскопијата се користи за споредба на активна супстанција во таблетирана (компресирана) и некомпресирана форма. Спектарот на таблетата покажува дека структурните сигнали се задржани, што укажува на стабилност на молекуларната структура. Сепак, се забележуваат мали промени во хемиските поместувања. Овие отстапувања се должат на слаби интеракции меѓу активната супстанција и ексципиентите (на пример, површински ефекти предизвикани од микрокристалната целулоза). Така, примерот илустрира како NMR спектроскопијата може да открие суптилни интеракции со матриксот, дури и кога не се присутни значајни хемиски промени или деградација.

Табела 21. Предности и ограничувања на NMR спектроскопијата (автор)

Предности	Ограничувања
Детално структурно толкување	Висока цена и потреба од експертиза
Може да детектира аморфни и кристални состојби	Понекогаш е потребна голема количина на примерок
Квантитативна прецизност без стандарди	Solid-state анализата бара специјализирана опрема

NMR спектроскопијата, особено во својата solid-state форма, претставува незаменлива алатка во современата фармацевтска анализа. Таа овозможува:

- потврдување на молекуларната структура на активната супстанција;
- откривање интеракции во рамките на формулацијата;
- следење на физичко-хемиски промени што можат да настанат во текот на процесот на формулирање.

6.4.6. Раманова спектроскопија

Рамановата спектроскопија претставува недеструктивна аналитичка техника која се базира на нееластично расејување на светлината (раманов ефект) при интеракција на монохроматски ласер со молекулите на примерокот. Мал дел од расеаната светлина претрпува промена во фреквенцијата, при што се добива раманов спектар. Овој спектар содржи специфични вибрациони фреквенции кои се карактеристични за хемиската структура на испитуваниот материјал и овозможуваат негова идентификација и карактеризација.

Оваа техника овозможува идентификација и карактеризација на различни цврсти форми на фармацевтски супстанции, како што се полиморфи, хидрати, аморфни форми и различни состојби на кристалност. Во фармацијата рамановата спектроскопија е особено значајна за следење на структурните промени на активните супстанции во

текот на формулацијата, компресијата и складирањето. Притоа, таа овозможува откривање трансформации помеѓу кристални и аморфни форми, кои директно можат да влијаат врз растворливоста, стабилноста и биорасположливоста на лекот.

Техниката овозможува локализирана анализа на површината на таблети или пелети (сферични гранули) со помош на раманов микроскоп, како и добивање просторни хемиски мапи (раманово мапирање) за визуелизација на распределбата на активната супстанција или ексципиентите во дозираната форма. Благодарение на тоа, рамановата спектроскопија е особено корисна при испитување облоги за контролирано ослободување, проценка на хетерогеноста на формулацијата, следење на дифузијата на активната супстанција во матриксот, како и при анализа на нејзината физичка стабилност.

Рамановата спектроскопија често се комбинира со други аналитички техники:

- XRPD (за потврда на кристална структура);
- PLM или SEM (за морфолошка анализа);
- NMR (за детална структурна карактеризација).

Пример: Следење на полиморфна трансформација

Рамановата спектроскопија може да се користи за откривање полиморфни трансформации кај таблети складирани во услови на висока влажност. Во ваков случај, со техниката е забележано формирање нова полиморфна форма на површината на таблетата, додека внатрешноста ја задржала кристалната структура. Овој пример илустрира како методот може да открие локализирани промени што не би биле забележливи со други техники и како таквите сознанија можат да послужат за подобрување на дизајнот на облогата со цел поголема отпорност на влага.

Придобивките од рамановата спектроскопија се: висока брзина на изведување, едноставност на методот, можност за анализа без подготовка на примерокот и *in situ* мониторинг во реално време. Како главни ограничувања се издвојуваат: потенцијалната интерференција од флуоресценција, потребата од прецизна калибрација и намалената чувствителност при испитување на супстанции во многу ниски концентрации.

Рамановата спектроскопија е моќна алатка која наоѓа широка примена во контрола на квалитетот, развојот на фармацевтски формулации и регулаторната поддршка, овозможувајќи детална и прецизна анализа на цврстите дозирани форми.

6.4.6.1. Споредба на раманова и NMR спектроскопија во карактеризација на фармацевтски супстанции

Рамановата и NMR спектроскопијата претставуваат две клучни аналитички техники што нудат различни, но меѓусебно комплементарни информации за фармацевтските супстанции.

Основниот принцип на рамановата спектроскопија се темели на нееластично расејување на ласерска светлина од молекулите на примерокот, при што промената на енергијата на расеаната светлина овозможува добивање вибрационен спектар што претставува уникатен „отпечаток“ на молекуларната структура. NMR, пак, се базира на магнетните својства на одредени јадра, најчесто ^1H и ^{13}C . Кога молекулите се изложени на силно магнетно поле и радиофреквентно зрачење, овие јадра апсорбираат и потоа емитуваат енергија, создавајќи спектар што дава информации за хемиската средина и меѓусебната поврзаност на атомите.

Разликите во *информациите* што ги обезбедуваат двете техники се значајни. Рамановата спектроскопија е особено корисна за идентификација на кристални форми, следење на полиморфизам, хидрати, аморфни состојби и проценка на распределбата на активната супстанција во цврсти дозирани форми. Чувствителна е на вибрациите на молекуларните врски и овозможува локализирана анализа без нарушување на примерокот. NMR спектроскопијата, пак, обезбедува многу подетални информации за молекуларната структура. Таа открива изомеризација, конформации и интеркации меѓу

активната супстанција и ексципиентите, а воедно нуди висока прецизност при квантитативна анализа.

При *подготовката на примерокот* рамановата спектроскопија има јасна предност бидејќи најчесто не бара дополнителни постапки и може да се примени *in situ*, директно на примерокот. За разлика од неа, NMR спектроскопијата, вообичаено, подразбира растворање на примерокот во деутерирани растворувачи, освен во случај на solid-state NMR, која овозможува анализа на примероци во цврста состојба, но претставува значително посложена и поскапа техника.

Во однос на *ограничувањата*, примената на рамановата спектроскопија може да биде попречена од појава на флуоресценција, а нејзината чувствителност е ограничена кога се работи за супстанции во ниски концентрации. Од друга страна, NMR е високо специфична и чувствителна техника, но се одликува со повисоки трошоци, подолг временски процес и потреба од значителна експертиза.

Во контекст на *следење промени*, рамановата спектроскопија е особено погодна за мониторинг на полиморфни и кристални трансформации, како што се оние што настануваат при складирање во услови на висока влажност или при компресија на таблети. Од друга страна, NMR спектроскопијата е поадекватна за следење молекуларни интеракции помеѓу активната супстанција и ексципиентите, како и за истовремена квантификација на активната супстанција и нејзините потенцијални деградациски продукти.

Пример: Карбамазепин како модел за полиморфни трансформации

Карбамазепинот претставува антиепилептичен лек, познат по тоа што постои во повеќе полиморфни форми (I–IV), како и во дихидратна форма. Полиморфизмот кај овој лек значително влијае врз неговата растворливост, стабилност и, како последица, врз неговата биорасположливост.

Рамановата спектроскопија е особено корисна за брза проверка на таблети складирани во различни услови на температура и влажност. Со оваа техника можат да се откријат полиморфни трансформации директно на површината на таблетата, без потреба од дополнителна подготовка или оштетување на примерокот.

¹³C NMR спектроскопијата овозможува прецизно разликување на различните полиморфни форми преку анализа на хемиските поместувања на клучните јаглеродни атоми. Дополнително, квантитативната NMR спектроскопија се користи за точно определување на количината на карбамазепин, како и за следење на неговата хемиска деградација при изложување на топлина и светлина.

Конечно, може да се заклучи дека рамановата спектроскопија и NMR снимањето претставуваат комплементарни техники за физичко-хемиска карактеризација на фармацевтски супстанции. Рамановата спектроскопијата е особено корисна за следење структурни и кристални промени, додека NMR спектроскопијата обезбедува подлабоко разбирање на молекуларната структура и стабилноста, како и висока прецизност при квантификација. Во современиот фармацевтски развој паралелната примена на овие техники овозможува сеопфатно разбирање на својствата на лековите и обезбедува гаранција за нивниот квалитет, конзистентност и регулаторна усогласеност.

6.5. High-throughput техники во фармацевтските анализи на цврсти дозирани форми

6.5.1. Блиско-инфрацрвена (NIR) спектроскопија

NIR спектроскопијата претставува моќна и брза аналитичка техника за неструктивна анализа на цврсти дозирани форми, прашоци и суровини. Таа се заснова на апсорпција на електромагнетно зрачење во блиско-инфрацрвениот регион (околу 780–2500 nm), при што се добиваат информации за вибрационите премини на молекуларни врски како C–H, N–H и O–H, кои се карактеристични и многу чести во активните супстанции и ексципиентите.

Од крајот на XX век NIR спектроскопијата бележи сè поширока примена во фармацевтската индустрија, како за квалитативна и квантитативна анализа така и за процесна контрола. Главните предности на оваа техника се нејзината способност за анализа без подготовка на примерок, многу висока брзина на мерење (во рамки на секунди), недеструктивниот карактер и можноста за мониторинг во реално време и директно во текот на производството. Благодарение на овие својства, NIR спектроскопијата е особено погодна за идентификација на влезни сировини, проверка на воедначеноста на содржината кај готовите производи, како и за следење на клучни производни процеси (гранулација, сушење и таблетирање).

Генерално, првичните инструменти за NIR спектроскопија работеле во режим на рефлектанца, кој има одредени ограничувања поради мешањето на сигналот од површината и ограничената пенетрациска моќ. Современите уреди, пак, се развиени со можност за преносен режим, при што инфрацрвената светлина минува низ целиот примерок и овозможува добивање посеопфатни информации за неговата внатрешна структура и состав. Овој технолошки напредок обезбедува повисока чувствителност и подобар однос сигнал-шум, што е особено значајно при анализа на таблети и капсули.

Клучен момент за поширокото регулаторно прифаќање на методите базирани на NIR спектроскопија беше развојот на водичите за валидација на аналитички методи, особено ICH Q2(R1). Во согласност со овие упатства, NIR методите се валидираат врз основа на повеќе параметри, меѓу кои:

- *специфичност*: способност да се разликуваат различни супстанции или формулации;
- *линеарност* и *опсег*: проверка дали сигналот е пропорционален со концентрацијата на супстанцијата;
- *точност* и *прецизност*: споредба на резултатите со оние добиени преку референтни методи (на пример, HPLC или титрација);
- *робустност* и *повторливост*: проценка дали методот останува стабилен при варијации во условите на мерење.

Во современата практика валидираните NIR методи се стандардизирани преку унифицирани протоколи што ги обединуваат различните упатства и регулативи. Тие веќе не се ограничени само на лабораториски анализи, туку се интегрирани и во самиот производен процес, во целосна согласност со принципите на cGMP.

6.5.1.2. Примена на NIR спектроскопијата во фармацевтската практика

Примената на NIR спектроскопијата во фармацевтската практика е широка и опфаќа клучни аспекти од производството и контролата на квалитет. Во продолжение се прикажани најчестите примери што ја илустрираат нејзината практична вредност како аналитичка техника.

I. Идентификација на влезни сировини

NIR спектроскопијата овозможува брза и сигурна диференцијација на супстанции со слична хемиска структура, како што се лактоза монохидрат и безводна лактоза, врз основа на нивните карактеристични NIR спектри. На овој начин значително се скратува времето потребно за контрола и потврда на идентитетот на сировините пред нивната понатамошна употреба во производниот процес.

II. Квантитативна анализа на активни супстанции

Со примена на мултиваријациона анализа, како што е методот на парцијални најмали квадрати (PLS), NIR спектроскопијата овозможува прецизно определување на содржината на активната супстанција во дозираната форма, дури и во присуство на повеќе ексципиенси. На овој начин овозможено е следење на воедначеноста на содржината без потреба од подготовка на примерокот, што значително ја поедноставува и ја забрзува контролата на квалитет.

III. Следење на сушење во флуидизиран слој

NIR сензорите можат да се интегрираат директно во процесната опрема, овозможувајќи континуирано мерење на влажноста на гранулите во реално време. На тој начин сушењето автоматски се прекинува кога ќе се постигне посакуваното ниво на влажност, што обезбедува конзистентен квалитет и ја намалува варијабилноста меѓу различните производствени серии.

IV. Следење на полиморфни трансформации

NIR спектроскопијата може да се користи и за следење на полиморфни трансформации, иако не е толку чувствителна како рамановата спектроскопија. Со примена на мултиваријациона статистичка обработка, како што е анализата на главни компоненти (PCA), која овозможува издвојување на најзначајните варијации во спектрите, можно е индиректно да се детектираат структурни промени во активната супстанција.

Пример: Анализа на парацетамол таблети

Парацетамолот, како една од најчесто користените активни супстанции, често се среќава во таблетни формулации со различни ексципиенси. NIR спектроскопијата во овој контекст може да се примени за повеќе цели:

- идентификација на активната супстанција преку карактеристичните апсорпциски пикови околу 1,5 и 2,0 μm ;
- квантитативно определување на содржината на парацетамол во таблетите со примена на методот на парцијални најмали квадрати, валидиран во согласност со ICH Q2(R1);
- следење на влажноста по сушење, со цел да се процени дали преостанатата вода може да влијае врз стабилноста на готовиот производ.

NIR спектроскопијата претставува современа, брза и ефикасна аналитичка техника што целосно одговара на потребите за недеструктивна и сигурна контрола во фармацевтската индустрија. Со соодветна валидација и калибрација таа може да ја замени или значајно да ја надополни примената на традиционалните техники, овозможувајќи повисока ефикасност, поголема сигурност и понапредна контрола на квалитетот во сите фази од производниот процес.

6.5.1.2.1. Примена на NIR спектроскопијата за идентификација на пакувани клинички дозирани форми

Во рамките на фармацевтските клинички испитувања обезбедувањето на точниот идентитет на испитуваните дозирани форми претставува клучен сегмент на контролата на квалитетот. Неправилната идентификација може да има сериозни последици врз безбедноста на пациентите и валидноста на добиените податоци. Во овој контекст NIR спектроскопијата се наметнува како особено вредна аналитичка алатка за квалитативна анализа и сигурна верификација на идентитетот на пакувани клинички дозирани форми.

Клучните предности на оваа техника ја прават особено применлива во клинички услови:

- *Недеструктивност*: овозможува анализа без потреба од отворање или оштетување на пакувањето;
- *Брзина на анализа*: резултатите се добиваат во рок од неколку минути;
- *Економичност*: трошоците се значително пониски во споредба со други спектроскопски или хроматографски методи.

Овие предности се особено важни во рамки на двојно слепите клинички студии, каде што не е можно да се изведе дури и визуелната идентификација на производите.

Вообичаено, клиничките дозирани форми (таблета со активна супстанција и плацебо таблета) често се пакуваат во идентична форма и во исто блистер пакување.

Со цел сигурна идентификација, развиен е метод базиран на NIR спектроскопија, кој овозможува брза и недеструктивна диференцијација меѓу различните варијанти на таблети во пакувањето. Овој метод е оптимизиран за примена во реални клинички услови, каде што точноста и ефикасноста се од клучно значење. Клучен елемент на овој пристап е создавањето библиотеки на спектри, специфични за секоја клиничка студија. Методологијата вклучува користење примероци од таблети со активна супстанција и од плацебо таблети, соодветно пакувани. Половина од примероците се користат за формирање на библиотеката, додека останатите служат за нејзина валидација. На тој начин анализата се заснова на реални производи што ќе се применуваат во студијата, што значително ја зголемува сигурноста и релевантноста на резултатите.

Добиените NIR спектри, обработени со анализа на главни компоненти (PCA), покажуваат јасна кластеризација, што ја потврдува способноста на методот да прави разлика помеѓу таблети со активна супстанција и плацебо формулации. Овие резултати демонстрираат дека NIR спектроскопијата може сигурно да детектира суптилни разлики во составот, дури и во ситуации кога класичната хемиска анализа или визуелна проверка не се изводливи без отворање на пакувањето.

Квалитативната NIR спектроскопија претставува иновативен и сигурен пристап за верификација на идентитетот на пакуваните клинички дозирани форми. Нејзината примена го поддржува интегритетот на клиничките испитувања, овозможувајќи брза, точна и недеструктивна проверка на производите подготвени за администрација. Во согласност со современите регулаторни барања и принципите на добра производна и добра клиничка практика, овој пристап претставува значаен придонес кон обезбедување на безбедноста и ефикасноста на испитуваните лекови.

6.5.1.2.2. Примена на NIR спектроскопијата за идентификација на суровини

Идентификацијата на суровини претставува еден од клучните чекори за обезбедување на квалитетот на готовиот производ. Во современата фармацевтска практика NIR спектроскопијата се наметнува како водечка техника за брза и недеструктивна проверка на влезните суровини. Регулаторните тела, како што се FDA и EMA, во голем број случаи бараат целосна проверка на идентитетот на сите суровини пред нивната употреба, наместо селективно земање примероци врз основа на статистички принципи.

За да може NIR спектроскопијата да се користи за оваа намена, методите мора да бидат усогласени со минималните стандарди наведени во Ph. Eur. Тоа подразбира валидиран и прецизен аналитички пристап, способен за јасна диференцијација меѓу различни суровини. Во основата на методологијата стои библиотека на спектри, која претставува збир на карактеристични спектрални профили за секоја позната суровина. Таа се создава преку снимање спектри од повеќе серии на иста суровина, нивно комбинирање во репрезентативен спектар и дефинирање на прифатлива спектрална варијабилност што ги опфаќа очекуваните разлики меѓу идните серии.

При анализа на нова суровина нејзиниот спектар се споредува со спектрите во библиотеката. Доколку спектарот се вклопува во дефинираниот прифатлив опсег за конкретната суровина, примерокот се потврдува како идентичен. Ако покажува значајни отстапувања, се отфрла. На овој начин се обезбедува сигурна и објективна идентификација, дури и кај суровини со сличен физички изглед или боја.

Библиотеката на спектри претставува динамичен систем кој може континуирано да се ажурира, и тоа при:

- воведување нови суровини;
- промена на физичките својства на суровините (големина на честици, влажност);
- исклучување на суровини кои повеќе не се користат во производниот процес.

Со ваквиот пристап NIR спектроскопијата се наметнува како ефективна и регулаторно прифатлива техника за идентификација на суровини. Таа овозможува:

- брзи и сигурни резултати;
- минимална манипулација со материјалот;
- висока точност и репродуктивност;
- целосна усогласеност со принципите на GMP и фармакопејските барања.

Примената на NIR спектроскопијата значајно ја зголемува ефикасноста и безбедноста во производниот синџир, обезбедувајќи континуиран квалитет и сигурност на готовите производи.

6.5.1.2.3. Примена на NIR спектроскопијата за оценување на хомогеност на смеса

Хомогеноста на смесата претставува еден од основните предуслови за обезбедување квалитет во фармацевтското производство, особено при изработка на дозирани форми. Добро хомогенизираната смеса обезбедува:

- воедначена распределба на активната супстанција;
- репродуктивност на дозите;
- конзистентност на терапевтскиот ефект.

NIR спектроскопијата се покажала како моќна алатка за следење на процесот на мешање и проценка на хомогеноста во реално време.

Во една студија хомогеноста на смесата била евалуирана преку комбинирање на визуелна проверка, споредба на добиените NIR спектри и примена на анализа на главни компоненти (PCA), која овозможила разликување и групирање на спектрите според различни временски точки на мешањето.

Во друга студија NIR спектроскопијата била применета како интегриран метод за контрола на квалитет во реално време, со поставување сензори директно во процесната опрема. Смеса составена од четири компоненти била хомогенизирана во V-блендер, а спектрите биле регистрирани во различни зони од блендерот (горна, средна и долна) и во повеќе временски интервали (1, 5, 10, 15 и 20 минути). На овој начин било можно да се следи динамиката на хомогенизација во текот на целиот процес. За секој временски интервал била пресметана релативната стандардна девијација (RSD) на податоците, на бранова должина специфична за активната супстанција. Резултатите биле споредени со референтна анализа со HPLC. Забележано е дека со зголемување на времето на мешање RSD постепено се намалува, а трендот на резултатите добиени со двете техники бил многу сличен. Ова ја потврдува применливоста на NIR спектроскопијата како сигурна и прецизна алатка за следење на хомогеноста, со дополнителна предност што анализата се изведува во реално време и без уништување на примероците.

Оттука NIR спектроскопијата се издвојува како практична алатка што овозможува:

- брза и недеструктивна проценка на смесите;
- оптимизација на времетраењето на мешањето;
- сигурно определување на крајната точка на процесот;
- унапредување на контролата на квалитетот пред фазата на компресија или полнење на капсули.

Примената на NIR спектроскопијата за следење на хомогеноста е во целосна согласност со принципите на процесната аналитичка технологија (Process Analytical Technology – PAT) и концептот „Дизајн заснован на квалитет“ (Quality by Design – QbD). Овие пристапи, активно промовирани од регулаторните тела, претставуваат основа на современото фармацевтско производство и имаат за цел да обезбедат стабилен квалитет и поголема безбедност на готовиот производ.

6.5.1.2.4. Примена на NIR спектроскопијата во квантитативна анализа

Квантитативната NIR спектроскопија претставува современа аналитичка алатка што овозможува автоматизација на аналитичкиот процес и добивање резултати со висока брзина (помалку од една минута по примерок). Техниката се одликува со недеструктивна проценка на поединечни единици и со можност за континуирано следење на квалитетот во реално време. Благодарение на овие карактеристики, NIR спектроскопијата е особено погодна за проверка на воедначеноста на содржината, за оценка на крајните дозирани форми и за мониторинг на клучните процеси во фармацевтското производство.

Иако во моментов не постојат посебни регулаторни водичи исклучиво за методи засновани на NIR спектроскопија, нивната валидација се спроведува според постојните упатства за аналитичка валидација, адаптирани за спектроскопски техники. Во таа насока се користи комбинација од повеќе извори: ICH Q2(R1) водичот за валидација на аналитички методи, барањата на фармакопеите (USP и Ph. Eur.), како и стандардите на Американското друштво за тестирање и материјали (ASTM). Валидацијата на квантитативен метод базиран на NIR спектроскопија треба да се изведува со реални производствени примероци и да го опфаќа интервалот од 80 до 120% од декларираната содржина.

Методолошки, анализата се заснова на развивање калибрациски модели, при што најчесто се користи повеќекратна линеарна регресија со избор на повеќе карактеристични бранови должини. Во една студија е покажана одлична усогласеност помеѓу резултатите добиени со NIR спектроскопија и оние со HPLC ($R = 0,994$), што ја потврдува применливоста на NIR спектроскопијата како соодветна алтернатива на класичните аналитички техники. По успешна валидација, NIR спектроскопијата овозможува брзо скенирање и автоматска обработка на податоците, што значи дека може да се испитаат голем број поединечни дози во текот на производството. Овој пристап значително се разликува од класичните методи, каде што контролата, вообичаено, се темели на ограничено земање примероци по случаен избор.

За разлика од хроматографските методи, резултатите од NIR спектроскопијата можат да бидат под влијание на физичките својства на примероците, како што се густината, големината на честичите и нивната влажност. Поради тоа класичните тестови за аналитички принос не се секогаш применливи. Наместо тоа, при развој и валидација на методите посебно внимание се посветува на изборот на соодветни бранови должини, математичката обработка на спектрите и контролата на варијациите во матрицата.

Денес квантитативната NIR спектроскопија се издвојува како брза, ефикасна и прилагодлива техника, која обезбедува:

- висока фреквенција на тестирање на поединечни единици, што претставува современа алтернатива на класичната статистичка контрола;
- усогласеност со барањата за GMP преку целосна проверка на произведените серии;
- ефикасна поддршка за следење и контрола на процесите во реално време, како дел од концептот на процесна аналитичка технологија.

6.5.2. Фибер-оптичко следење на растворливост

Во современата регулаторна практика *in vitro* тестот за ослободување на активната супстанција, односно тестот за растворливост, не се применува само како метод за контрола на квалитетот туку и како средство за предвидување на *in vivo* однесувањето на лекот. Ова е од особена важност при поднесување на апликации за нов лек во цврста дозирана форма со продолжено ослободување, кога регулаторните агенции очекуваат воспоставување на IVIVC. Во согласност со водичите на SUPAC, валидна IVIVC овозможува имплементација на промени во производниот процес, во локацијата или во добавувачите, без потреба од дополнителни и скапи *in vivo* студии. Клучен предуслов за воспоставување на IVIVC е добивањето точен и доволно детален

профил на растворливост, што бара современи методи за континуирано и сигурно прибирање податоци.

Традиционалните инструменти за тестирање на растворливост имаат низа ограничувања. Најчесто бараат рачно или полуавтоматско земање примероци во повеќе временски точки, што може да трае и до 24 часа. Исто така, овие методи бараат значителен ангажман на аналитичарот и се подложни на различни извори на грешки: од разредување и контаминација, до неточен пренос на примероци или механички дефекти на инструментот. Дополнително, класичните методи не овозможуваат следење на процесот во реално време со фреквенција споредлива со *in vivo* мерењата (на пример, на секои 10 до 15 минути).

Како одговор на овие предизвици развиени се фибер-оптички системи кои овозможуваат автоматизирано и континуирано следење на растворливоста, со што значително се зголемува точноста и ефикасноста на анализата. Во овие системи се користат UV-трансфлексантни сонди од типот *dip-in*, кои се поставуваат директно во медиумот за растворање и овозможуваат директен контакт со примерокот. Секоја сонда е поврзана со минијатурен спектрофотометар со фотодиодна низа, што овозможува снимање и обработка на податоците со висока фреквенција. На овој начин концентрацијата на активната супстанција може да се следи во реално време, без потреба од земање и обработка на примероци. Ваквиот пристап е еднакво применлив и за формулации со моментално, а и за оние со продолжено ослободување на активната супстанција, што дополнително ја зголемува неговата практична вредност во фармацевтската анализа.

Табела 22. Споредба на фибер-оптичките и конвенционалните системи за тестирање на растворливост (автор)

Карактеристика	Фибер-оптички системи	Конвенционални системи
Анализа во реално време	Да	Не
Степен на автоматизација	Висок	Ограничен/Рачен
Точност и репродуктивност	Високи	Променливи
Ризик од контаминација или загуба	Многу низок	Присутен
Одржување и стабилност на системот	Поедноставни	Подложни на дефекти

Фибер-оптичките системи за тестирање на растворливост претставуваат значаен чекор напред во автоматизацијата и модернизацијата на аналитичките процедури. Тие овозможуваат:

- добивање брзи, точни и доверливи профили на ослободување;
- поддршка за воспоставување на IVVC;
- усогласеност со SUPAC и другите регулаторни водичи;
- рационализација на работата во аналитичките лаборатории за контрола на квалитет.

Системот е целосно компјутерски контролиран, при што:

- се снимаат спектри во опсег од 200 до 400 nm во редовни интервали;
- податоците автоматски се обработуваат со валидиран софтвер;
- резултатите се архивираат во сигурна електронска база (EDQM, 2020b).

Бидејќи во системот нема подвижни делови, освен стандардниот апарат за растворливост, тој се одликува со стабилност и минимален ризик од механички

дефекти. Во случаи на заматеност или расејување на светлината, резултатите се коригираат со соодветни математички постапки, како што се корекција на основната линија или примена на алгоритми со втор дериват на спектралните податоци. На тој начин веднаш се добиваат достапни и прецизни резултати.

Пример: Таблети со моментално и контролирано ослободување

Кај **таблети со моментално ослободување** примената на *in situ* мерења со фибер-оптички сонди овозможува добивање профили на растворливост на секои 30 секунди. Високата фреквенција на мерење обезбедува детален увид во динамиката на ослободување и овозможува откривање дури и на мали разлики меѓу различни производи. Резултатите добиени со фибер-оптичките сонди се еднакво точни со оние добиени со класичниот HPLC метод заснован на рачно земање примероци.

Кај **таблети со продолжено ослободување** во траење од 12 часа фибер-оптичките сонди овозможиле добивање профили идентични по точност со оние добиени преку HPLC анализа. Притоа, мерењата изведени од различни аналитичари во различни денови покажале висока репродуктивност. Дополнителна предност е тоа што сондите остануваат фиксирани во апаратот за растворливост, со што се избегнуваат варијации поврзани со рачното земање примероци.

Табела 23. Придобивки од системите со фибер-оптички сонди (автор)

Карактеристика	Опис
Точност и репродуктивност	Еднакви со оние добиени со HPLC
Фреквенција на мерење	На секои 30 секунди, што овозможува детално профилирање
Позиционирање на сондите	Секогаш на стандардизирана позиција, без нарушување на условите
Автоматска корекција на расејување	Алгоритми базирани на втор дериват
Квалитативна и квантитативна анализа	Можно дури и при опалесценција на медиумот од ексципиенси
Валидација и стабилност	Високи аналитички перформанси и стабилност на резултатите
IVVC	Прецизно следење на временските точки на ослободување
Комбинација на тестови	Растворливост, идентификација, определување на содржина и воедначеност на содржина

Со примената на оваа технологија истовремено може да се изведат четири аналитички тестови: растворливост, идентификација, определување на содржина и воедначеност на содржина. Постапки кои традиционално би барале три до четири дена лабораториска работа се сведуваат на половина ден. Вклученоста на аналитичарот е минимална бидејќи системот автоматски ги собира, обработува и архивира податоците. На тој начин се обезбедува значително поголем обем сигурни информации, што овозможува подетална проценка на квалитетот на сериите и поефикасно донесување регулаторни одлуки.

6.5.3. Проточна инјекциска анализа (FIA)

Проточната инјекциска анализа (FIA) претставува современа, брза и автоматизирана аналитичка техника, особено погодна за рутинска контрола на квалитет. Таа најчесто се применува во ситуации кога не е потребна детална карактеризација на онечистувања кои веќе се познати и опишани во активната супстанција. Според ICH Q6A водичот, ваквите онечистувања не мора повторно да се анализираат во готовиот производ, освен ако постои потенцијален ризик од нивна трансформација или разградба за време на производниот процес. Ова регулаторна рамка овозможува употреба на високопроточни техники како FIA, со која е можно да се

изведат и до 100 анализи на час, што ја прави особено ефикасна за потребите на индустриската практика.

Основниот принцип на FIA се заснова на спектрофотометриска детекција, која е особено погодна кога интерференцијата од матриксот е минимална. Во ситуации кога присуството на ексципиенси предизвикува значајна интерференција, неопходно е примерокот да се прочисти. За таа цел, вообичаено, се применува цврсто-фазна екстракција со јонска размена, како и интегрирано прочистување на примерокот со органски растворувачи во самиот проточен систем, кои овозможуваат ефикасно отстранување на компонентите од матриксот и обезбедуваат почист сигнал за детекција.

За да се минимизира ефектот на матриксот, во FIA системите често се применуваат и алтернативни техники на детекција, меѓу кои најзначајни се:

- *хемилуминисцентни реакции*, кои се базираат на процеси како комплексирање со метални јони, редокс реакции или дериватизација со органски супстрати;
- *електрохемиска детекција*, која може да вклучи методи како поларографија, амперометрија и потенциометрија;
- *флуоресцентна детекција*, применлива кога е потребна висока чувствителност.

FIA наоѓа широка примена во брзата проценка на квалитетот на готовите производи. Кај таблетите со парацетамол е демонстрирана можност за обработка на околу 40 таблети во еден час, при што системот покажува стабилен и линеарен одговор, што ја прави техниката особено погодна за рутинска контрола на содржината. Слични резултати се постигнати и кај таблети со аспирин, каде што FIA овозможува анализа на приближно 65 таблети во еден час, притоа задржувајќи висока прецизност и ниско стандардно отстапување од околу 0,4%.

Табела 24. Предности на FIA во фармацевтската анализа (автор)

Предност	Опис
Брзина на анализа	Можност за изведување до 100 анализи во еден час
Автоматизација	Минимална потреба од рачно ракување со примероци
Приспособливост	Комбинација со различни типови детектори и постапки за прочистување
Прецизност и повторливост	Ниско стандардно отстапување помеѓу мерењата ($\leq 0,4\%$)
Рутинска контрола на квалитет	Особено погодна за сериска контрола на производството

6.5.4. Роботика и лабораториска автоматизација

Потребата од голем обем податоци за регистрација на готовите производи доведе до забрзан развој на автоматизирани лабораториски техники, кои во изминатите неколку децении претрпеа значајни усовршувања. Првите автоматизирани системи, познати како автоанализатори, се засновале на принцип на континуиран проток на примероци низ тенки цевки. За да се избегне мешање на различните примероци, меѓу нив се воведувале воздушни меурчиња кои делувале како природни раздвојувачи. Иако автоанализаторите наоѓале широка примена, со текот на времето биле напуштени поради високата техничка сложеност и честите, скапи интервенции за одржување.

Во последните три децении се развиени напредни роботизирани системи, наменети за автоматизација на голем број рутински лабораториски постапки. Современите решенија овозможуваат:

- изведување на операции што порано се вршеле рачно;
- континуирано надгледување без потреба од постојано присуство на оператор;
- анализа на цврсти дозирани форми со висока точност, прецизност и проточност.

Првичните предизвици, како несоодветниот дизајн, честите дефекти, сложените кориснички интерфејси и тешкотиите при програмирање во голема мера се надминати во современите системи. Денес автоматизацијата ги опфаќа речиси сите чекори на лабораториската анализа: од автоматско ракување со примероци, преку мерење и пресметка на резултати, до автоматско генерирање и архивирање извештаи.

Во контрола на квалитет автоматизираните системи рутински се користат за определување на содржината на активната супстанција, тестирање на воедначеноста на содржината, испитување на растворливост и определување влага. Нивната примена е клучна при пуштање на готовите производи во промет, како и во студиите за стабилност, каде што се бара висока точност и репродуктивност. Во современата фармацевтска индустрија некои компании имаат воспоставено централизиран и децентрализиран роботизирани лаборатории, со капацитет да генерираат десетици илјади аналитички резултати на годишно ниво.

Табела 25. Споредба на рачни и роботизирани аналитички техники (автор)

Карактеристика	Рачни техники	Роботизирани техники
Вклученост на аналитичарот	Висока – постојано рачно ракување	Минимална – потребно е само иницијално поставување
Брзина на анализа	Ограничена – неколку анализи на час	Висока – до стотици анализи на час
Точност и прецизност	Зависи од операторот	Конзистентна, со минимални варијации
Ризик од човечки грешки	Висок	Низок
Генерирање извештаи	Рачно	Автоматско
Примена	Рутински и истражувачки анализи	Рутинска контрола, анализа на серии, студии за стабилност
Барања за одржување	Минимални	Поголеми – потребно редовно техничко одржување
Флексибилност на методи	Висока	Ограничена (претходно програмирани методи)
Простор и инфраструктура	Потребно е релативно мал простор	Поголем простор и специјализирана инфраструктура
Иницијална инвестиција	Ниска до средна	Висока

Современата автоматизирана лабораторија за контрола на квалитет функционира како интегриран систем во кој сите чекори на анализата се меѓусебно поврзани. Процесот започнува со прием на примероци, при што роботизираните системи со баркод скенери обезбедуваат нивна идентификација и автоматски внес во базата. Потоа следи подготовка, која опфаќа автоматизирано дозирање, дробење на таблети, растворање и разредување.

Анализата се врши во интегрирани системи за: UV/Vis спектроскопија, HPLC, тестови за растворливост, одредување на влага и маса. Податоците веднаш се обработуваат преку валидиран софтвер за анализа во реално време, кој поседува можност за статистичка обработка и следење на трендови.

По завршување на анализите извештаите автоматски се складираат во LIMS (Laboratory Information Management System), со кој се обезбедува безбедна архива. Целиот процес е под централен надзор и контрола преку графички интерфејс (GUI), што овозможува управување со сите активности од една станица.

6.6. Идни насоки во фармацевтските анализи на цврсти дозирани форми

Во текот на последниот век фармацевтската анализа на цврстите дозирани форми доживеа значаен технолошки напредок. Практиката постепено се префрли од класични техники како гравиметрија, титриметрија и тенкослојна хроматографија кон современи и софистицирани техники како HPLC, GC и целосно автоматизирани системи за анализа. Овие иновативни пристапи овозможуваат значително зголемување на прецизноста, ефикасноста и репродуктивноста при оценката на квалитетот на лековите.

Во иднина се очекува развојот да се движи кон целосна интеграција на високопроточни автоматизирани системи кои ќе овозможат изведување голем број тестирања со минимална или целосно елиминирана интервенција од страна на аналитичарот. Овие технологии ќе имаат клучна улога во обезбедувањето рутински и брзи резултати, кои целосно ќе бидат усогласени со строгите регулаторни барања.

Особено значајна улога во идниот развој на анализите на цврстите дозирани форми ќе имаат:

- **хеометријата и статистичките експертски системи**, кои ќе овозможат обработка и интерпретација на големи количини спектрални и хроматографски податоци добиени при анализа на таблети и капсули;
- **интегрираните анализи на работно место (*at-line, on-line u in situ*)**, кои ќе овозможат следење на критичните параметри во производниот процес (мешање, гранулација, сушење, компресија) во реално време, како и оптимизација на производните услови;
- **микроаналитичките уреди** (како, на пример, „лабораторија на чип“), кои ќе овозможат брза идентификација на активните супстанции и оценка на квалитетот со минимална количина примерок, што е корисно при развој и контрола на таблети со комплексни формулации;
- **недеструктивните техники** (особено NIR спектроскопијата), кои имаат потенцијал да овозможат анализа на секоја поединечна дозирана единица (таблета или капсула) за идентификација, квантитативна проценка и тестирање на воедначеноста на содржината, без потреба од уништување на примерокот.

Во фокусот ќе бидат и функционалните тестови, чија цел е да се процени способноста на цврстите дозирани форми да ја ослободат активната супстанција под физиолошки услови. Таквите тестови се суштински за докажување на терапевтската ефикасност и за гарантирање на конзистентноста на сериите.

Фармацевтската индустрија треба да ги прифати и интегрира овие современи аналитички алатки, не само во фазата на развој, туку и во рутинската контрола на квалитет. На тој начин ќе се обезбеди подобра контрола на производниот процес, како и објективна проценка на серијата, со цел побрзо пуштање на готовите производи во промет.

Во овој контекст, аналитичките хемичари ќе имаат сè поголема улога, не само како изведувачи на тестови, туку и како креатори на стратегии за контрола, предвидување и оптимизација на квалитетот на лековите.

7. ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ НА ПАРЕНТЕРАЛНИ ДОЗИРАНИ ФОРМИ

Парентералните дозирани форми претставуваат стерилни фармацевтски производи кои се администрираат преку инјекција, односно вон гастроинтестиналниот тракт, директно во ткивата или во системската циркулација. Тие може да се сретнат во форма на стерилен раствор, суспензија, емулзија или лиофилизиран прашок што се реконституира непосредно пред примената (Avis et al., 1992).

За разлика од оралните лекови, кои мора да поминат низ дигестивниот систем и да ја совладаат хепаталната метаболичка бариера, парентералните лекови овозможуваат директно и брзо постигнување на терапевтски ефект.

Најчесто користени начини на парентерална администрација се:

- **интравенски** (во вена) – кога е потребно моментално дејство, бидејќи лекот директно се внесува во крвотокот;
- **интрамускулно** (во мускул) – кога е потребно побавно, но подолготрајно дејство;
- **поткожно** (под кожа) – најпогоден начин за самостојна примена (апликација на инсулин).

Покрај најчестите, постојат и поретки патишта на парентерална администрација, како што се: **интратекално** (во 'рбетниот канал), **интраартериски** (во артерија), **интрадермално** (во дермисот), **интраепидурално** (во епидуралниот простор) и **интраспинално**. Овие патишта се применуваат исклучиво за специфични цели, како, на пример, при апликацијата на лекови директно во централниот нервен систем, за постигнување локализиран терапевтски ефект или во рамки на одредени дијагностички процедури.

Една од главните предности на парентералните дозирани форми е брзината на дејство. При интравенска примена лекот делува речиси веднаш, што е од суштинско значење во акутни и животозагрозувачки состојби. Дополнително, овие форми обезбедуваат висока биорасположливост бидејќи го заобиколуваат првичното минување низ црниот дроб и дигестивната ензимска деградација. Парентералните лекови имаат предност и кај пациенти кои се во бессознание, кои повраќаат или не можат да примаат лекови по орален пат.

Сепак, парентералните дозирани форми имаат и свои ограничувања. Најочигледен недостаток е непријатноста и болката при апликацијата, бидејќи таа подразбира употреба на стерилна игла. Дополнително, постои зголемен ризик од инфекции, затоа што со директно инјектирање во организмот се заобиколуваат природните одбранбени бариери против патогени. Исто така, ризикот од грешка при дозирање или неправилна примена е повисок, а последиците можат да бидат сериозни.

Производството и контролата на парентералните дозирани форми се значително посложени и поскапи во споредба со оралните. Потребно е строго придржување кон стандарди за стерилност, изотоничност, апиногеност и обезбедување соодветна физичко-хемиска стабилност. Бидејќи овие форми се администрираат директно во организмот, нивната безбедност и квалитет мора да бидат гарантирани преку исполнување на строгите фармакопејски и регулаторни барања.

Секој парентерален производ мора да биде стерилен, апиноген (ослободен од ендотоксини што можат да предизвикаат покачена телесна температура), со физиолошки прифатлива рН вредност и изотоничен состав. Дополнително, потребно е да се обезбеди негова хемиска и физичка стабилност во текот на целиот деклариран рок на употреба.

За време на производството се применуваат специјализирани техники за асептична подготовка, стерилизација и контрола на квалитетот. Во рамките на овие постапки се спроведуваат тестови за стерилност, контрола на присуство на честици и проценка на физичко-хемиските својства.

Парентералните дозирани форми претставуваат значаен сегмент од современата фармакотерапија, особено во болнички услови и при итни состојби. Нивната брза, ефикасна и прецизна испорака на активната супстанција ги прави незаменливи, иако истовремено бараат висока стручност, внимателна манипулација и

строга контрола на квалитетот. Познавањето на нивните својства, начини на апликација, предности и ограничувања е од суштинско значење за секој фармацевт, со цел обезбедување безбедна и ефективна терапија за пациентите.

7.1. Фармацевтски анализи во текот на преформулација и формулација на парентерални дозирани форми

Процесот на развој на парентерална дозирана форма започнува со фазата на преформулација, која претставува критичен чекор за целосно разбирање на својствата на активната супстанција и нејзината соодветност да биде вклучена во формулацијата. Овој процес опфаќа темелна анализа на физичко-хемиските својства и компатибилноста на активната супстанција со ексципиентите што ќе се користат во готовиот производ.

Во оваа фаза се испитуваат следниве својства на активната супстанција:

- *органолептички својства*: боја и мирис;
- *морфологија на честиици*: големина, облик и степен на кристалност;
- *термички својства*: точка на топење и термички профил;
- *хигроскопност*: способност за апсорпција на влага;
- *спектроскопски профил*: апсорпциски спектри (UV, IR);
- *растворливост*: како функција на pH (во опсег на pH од 2 до 11);
- *pH и pK_a вредност*: pH на раствор и киселинско-базна дисоцијација;
- *стабилност*: како функција на pH, термостабилност, фотостабилност, оксидативна стабилност;
- *забрзана стабилност*: преку изложување на стрес-услови;
- *профил на онечистувања*: идентификација и карактеризација на деградациски продукти и други потенцијални онечистувања.

Еден од најчестите предизвици при развојот на парентерални дозирани форми е ограничената растворливост на активната супстанција во вода (Strickley, 1999). Затоа се применуваат пристапи како формирање соли, прилагодување на pH со пуфери и употреба на корастворувачи (пропилен гликол, етанол, полиетилен гликол). Растворливоста и стабилноста се следат во широк опсег на pH, при што најчесто се користат аналитички техники како HPLC. Иако во оваа фаза не е неопходен целосно валидиран метод, истиот мора да биде доволно селективен за да ја разликува активната супстанција од нејзините деградациски продукти (Sweetana & Akers, 1996).

Парентералните дозирани форми може да се класифицираат на:

- *Парентерални дозирани форми со мал волумен*: до 100 mL, најчесто за индивидуални инјекции (раствори, суспензии и емулзии);
- *Парентерални дозирани форми со голем волумен*: над 100 mL, често за инфузии;
- *Лиофилизирани производи*: добиени со процес на сушење со замрзнување (лиофилизација), погодни за нестабилни супстанции.

За успешно формулирање на парентерална дозирана форма потребно е да се разгледаат следниве фактори:

- I. **Избор на соодветен носач**: вода за инјекции, неводен растворувач (како, на пример, масла), корастворувачи;
- II. **Избор на соодветни ексципиенти**: *пуфери* (за контрола на pH); *антиоксиданси*, како, на пример, натриум метабисулфит (за спречување на оксидација); *антимикробни средства* (кај повеќедозни препарати); *средства за прилагодување на осмолалноста*, како, на пример, натриум хлорид; *хелатори*, како, на пример, EDTA; *сурфактанти и суспендирачки средства* (за стабилизирање на емулзии и суспензии);

- III. **Опрема за производство:** *материјал на садот* (не'рѓосувачки челик, стакло, тефлон); *компатибилни филтри и цевки* (за спречување апсорпција или други реакции); *хомогенизатори* (за емулзии и суспензии); *опрема за лиофилизација*;
- IV. **Метод на стерилизација:** *терминална стерилизација* (како, на пример, автоклавирање) или *асептична постапка* (кога активната супстанција не е стабилна на високи температури);
- V. **Систем за пакување:** садови (ампули, шишенца), затвораачи и интегритет на системот;
- VI. **Стабилност на готовиот производ:** следење промени предизвикани од светлина, кислород, влага, температура и примена на студии за стабилност според насоките на ICH.

За обезбедување функционална и безбедна парентерална дозирана форма се препорачуваат следниве студии:

- растворливост на активната супстанција и ексципиенсите во вода и корастворувачи;
- компатибилност со различни пуфери;
- интеракции со материјали на опремата и пакувањето: евалуација на адсорпција или интеракција со цевки, филтри и затвораачи;
- стерилизација: евалуација на термичка стабилност преку автоклав;
- паралела со иновативен производ: при развој на генерички лек;
- тестирање на садот и затворањето;
- големина на честици: за суспензии;
- големина на капки: за емулзии;
- содржина на вода: за лиофилизирани производи;
- фотостабилност и чувствителност на кислород.

Развојот на парентерална дозирана форма е комплексен процес кој бара детална карактеризација на активната супстанција, прецизен избор на ексципиенси и опрема, како и темелно тестирање на стабилноста и стерилноста на производот (Strickley, 1999). Со систематски пристап кон преформулацијата и формулацијата се овозможува производство на безбеден, стабилен и ефикасен парентерален производ, што е од суштинско значење во современата фармацевтската практика.

Поголемиот дел од студиите спроведени во фазите на преформулација и формулација бараат квантитативна анализа на активната супстанција и критичните ексципиенси присутни во формулацијата. Овие анализи се клучни за:

- потврдување на јачината (концентрацијата) на активната супстанција во растворот;
- следење на стабилноста и можната деградација;
- одредување на растворливоста во различни медиуми;
- евалуација на компатибилноста со ексципиенси и материјали за пакување;
- потврда на интегритетот на производот со текот на времето.

Со оглед на потребата за прецизност, селективност и чувствителност, најчесто применувана аналитичка техника за овие цели е HPLC. Методите базирани на HPLC овозможуваат:

- јасно раздвојување на активната супстанција од нејзините потенцијални деградациски продукти;
- квантификација на активната супстанција и онечистувањата;
- евалуација на профилот на стабилност под различни услови;
- следење на чистотата и компатибилноста на формулацијата низ целиот рок на употреба.

Иако во раните фази на развој не е задолжителна целосна валидација на методот, се препорачува употреба на развоен и валидиран HPLC метод, кој демонстрира доволна точност, прецизност и специфичност за поставената намена. Таквиот пристап обезбедува сигурност при донесување научно засновани заклучоци за понатамошна оптимизација и формулација.

7.2. Аналитичко тестирање на готови парентерални дозирани форми

Парентералните дозирани форми поради нивната стерилна природа и директната администрација во системската циркулација бараат највисоко ниво на контрола на квалитетот. За обезбедување безбедност, ефикасност и стабилност на готовиот производ, неопходно е спроведување детални хемиски и микробиолошки тестирања во согласност со важечките фармакопејски стандарди (Avis et al., 1992).

7.2.1. Хемиско тестирање на готови парентерални дозирани форми

Хемиските тестови имаат за цел да потврдат дека производот содржи точна количина активна супстанција и дека е стабилен и соодветен за примена. Типичното хемиско тестирање на готовите парентерални дозирани форми вклучува:

- *Тест за идентификација на активната супстанција*: Потврда на присуството на активната супстанција со спектроскопски или хроматографски методи;
- *Определување на содржината на активната супстанција*: Квантитативно определување на количината на активна супстанција во готовиот производ;
- *Определување на онечистувањата и деградациските продукти*: Идентификација и квантификација на соединенија поврзани со синтезата, складирањето или производниот процес;
- *pH вредност*: Следење на киселинско-базната рамнотежа, која е важна за стабилноста и компатибилноста;
- *Осмолалност*: Определување на концентрацијата на осмотски активни честичи, која е важна за биолошката компатибилност;
- *Изглед*: Визуелен преглед на бојата, транспарентноста и присуството на видливи честичи;
- *Квантитативна анализа на критичните ексципиенси*: На пример, определување на содржината на декстроза и нејзините деградациски продукти (5-хидроксиметилфурфурал и етанол);
- *Распределба на големината на честичите/капките*: За суспензии и емулзии, потребно е да се процени распределба на големината на честичите/капките, со цел оценување на хомогеноста и стабилноста;
- *Содржина на вода*: За лиофилизирани производи влагата се контролира како критичен параметар за стабилност.

7.2.2. Микробиолошко тестирање на готови парентерални дозирани форми

Микробиолошките тестови обезбедуваат доказ за стерилноста на производот и неговата безбедност во однос на пирогени и микробиолошка контаминација. Типичното микробиолошко тестирање на готовите парентерални дозирани форми вклучува:

- *Тест за стерилност*: Фармакопејски метод за потврдување дека производот е без живи микроорганизми;
- *Тест за бактериски ендотоксини (Limulus Amebocyte Lysate – LAL)*: Детекција на бактериски ендотоксини – пирогени супстанции кои може да предизвикаат покачување на телесната температура и фебрилни реакции во организмот;
- *Контрола на присуството на субвидливи честичи*: Детекција на субвидливи честичи, што е особено критично за интравенски препарати;
- *Биооптоварување*: Се спроведува при производство на големи серии, со цел проценка на микробиолошката контаминација пред стерилизација;
- *Тест за интегритетот на садот и затвораот*: Проверка дали пакувањето обезбедува целосна заштита од микробиолошка контаминација.

Овие тестирања се клучен дел од системот за обезбедување квалитет и мора да се спроведуваат со верификувани, а по потреба и валидирани аналитички методи. Користењето соодветна лабораториска опрема и соодветната обученост на персоналот се од суштинско значење за доследно исполнување на стандардите за безбедност и ефикасност на парентералните дозирани форми.

7.3. Тестирање на материјалот за пакување на парентералните дозирани форми

Материјалот за пакување на парентералните дозирани форми игра клучна улога во обезбедувањето на нивната стабилност, стерилност и безбедност. Најчесто се користат три основни типа материјали:

- стаклени или пластични садови;
- еластомерни затворачи;
- пластични кеси.

Изборот на материјал за пакување зависи од неговата компатибилност со формулацијата, начинот на администрација, методот на стерилизација и условите на складирање.

7.3.1. Стаклени садови

Најшироко користен тип стакло за парентерални дозирани форми е боросиликатното стакло (тип I), дефинирано според USP. Овој тип стакло обезбедува висока хемиска стабилност и отпорност на вода и киселини, и како такво се користи за изработка на ампули, вијали и инфузиски шишиња (Abendroth & Clark, 1992). Стаклата тип II и тип III имаат пониска хемиска отпорност и не се препорачуваат за парентерални дозирани форми.

Фармакопејските тестови за стакло вклучуваат (USP, 2000b):

- тест за пренос на светлина;
- тест за хемиска отпорност;
- тест за стакло во прав;
- тест за хидролитичка отпорност на стакло на 121 °C;
- тест за присуство на арсен.

Добавувачите на стаклени садови најчесто обезбедуваат сертификат за анализа и усогласеност, кој може да се користи како дел од регулаторната документација.

И покрај својата стабилност, стаклото може да ослободува алкални супстанции кои влијаат на pH вредноста на готовиот производ, особено кај кисели или неутрални формулации (Abendroth & Clark, 1992). Овој ефект е поизразен кај парентерални дозирани форми со мал волумен поради поголемиот однос меѓу површината на стаклото и волуменот на растворот.

Затоа при развој на производот се спроведуваат студии за влијанието на стаклениот сад врз pH вредноста и стабилноста на лекот, како во текот на стерилизацијата, така и за време на складирањето.

7.3.2. Пластични садови

Пластичните садови се користат за пакување интравенски раствори, течности за иригација, претходно наполнети шприцеви и апликаторски системи. Главна предност на овие материјали е нивната отпорност на кршење, што ги прави погодни за лекови со висока токсичност (како, на пример, онколошки лекови).

Најчесто користени пластични материјали се:

- поливинил хлорид (PVC);
- полипропилен (PP);
- полистирен (PS);
- целулозни деривати.

Фармакопејските тестови за пластични садови опфаќаат (USP, 2000b):

- тест за пренос на светлина;
- биолошки тестови;
- физичко-хемиски тестови;
- тестови за екстрактибилни супстанции.

По нив, се спроведува студија за компатибилност со лекот, која ги оценува можните промени при контакт со пластиката, кои вклучуваат проценка на:

- ефектот на стерилизацијата врз лекот и пластичниот материјал;
- потенцијалното мигрирање на супстанции од пластиката во лекот;
- стабилноста на лекот при долгорочно складирање.

7.3.3. Еластомерни затворачи

Еластомерните компоненти, како што се затворачи за вијали, клипови за шприцеви и други приклучоци, се критични за безбедноста на парентералните дозирани форми (Smith & Nash, 1992). Поради нивната непосредна интеракција со формулацијата, тие мора да бидат внимателно избрани и тествани.

Клучни критериуми при избор на еластомерен материјал се:

- пренос на кислород;
- пренос на водена пара;
- притисок потребен за пункција;
- способност за повторно затворање по прободување;
- биокомпатибилност;
- отстранување на ендотоксини и детергенти;
- механичка цврстина (сила на кинење).

Фармакопејските тестови за еластомери се дефинирани според USP. Добавувачите често обезбедуваат техничка поддршка при избор на материјал, но финалната одлука се заснова на студиите за компатибилност со конкретната формулација.

Овие студии треба да опфатат (USP, 2000b):

- адсорпција на лекот на површината на еластомерот;
- апсорпција на лекот во структурата на материјалот;
- дифузија на лекот низ затворањето;
- присуство на екстрактибилни супстанции што можат да влијаат врз стабилноста или безбедноста на лекот.

Овој пристап овозможува систематско и регулаторно усогласено оценување на сите материјали за пакување на парентералните дозирани форми, со што се обезбедуваат квалитетот и безбедноста на готовиот производ.

7.4. Поддршка за развој на парентерални дозирани форми

За да може да започне фазата на преформулација во развојот на парентералните дозирани форми, неопходно е претходно да се воспостави сигурен аналитички метод. Овој метод мора да биде доволно селективен за да ја разликува активната супстанција од нејзините деградациски продукти, со што ќе служи како индикатор за стабилност (Weisner, 1998). Таквите методи овозможуваат следење на можни промени во составот на формулацијата за време на развојот, производството и складирањето.

Титриметриските методи и методите базирани на UV/Vis спектроскопија не се соодветни за оваа намена, бидејќи не можат да ја разликуваат активната супстанција од нејзините деградациски продукти. Поради ова, во последниве години, методите базирани на HPLC се најшироко користени за оваа цел. Овие методи овозможуваат

висока селективност, чувствителност и репродуктивност, а истовремено се применливи за широк спектар хемиски соединенија.

Во раните фази на развој најчесто не се достапни референтни стандарди за деградациските продукти. Затоа нивното присуство се квантифицива приближно, како процент од вкупната површина на пиковите на хроматограмот.

Прелиминарната валидација на аналитичкиот метод е задолжителна и вклучува оценка на точноста, прецизноста и линеарноста. За верификација на линеарноста се анализираат примероци со концентрации од 75%, 100% и 125% во однос на очекуваната концентрација на активната супстанција. Специфичноста на методот се докажува преку студии на форсирана деградација, при кои лекот се изложува на различни стрес-услови (топлина, кисела или алкална средина, светлина, оксидативни агенси). Потоа деградираниот примерок се анализира со HPLC за да се утврди дали сите деградациски продукти се јасно одделени од пикот на активната супстанција. Според фармацевтските водичи хроматографската резолуција помеѓу пикот на активната супстанција и соседните пикови треба да биде најмалку 2. Дополнително, чистотата на пикот на активната супстанција се потврдува со употреба на детектор со диодна низа, кој овозможува проверка на спектралната конзистентност на пикот.

Овој систематски пристап обезбедува аналитичка сигурност и претставува основа за следните фази од развојот, како што се формулацијата, студиите на стабилност, процесната контрола и производството.

7.5. Тестирање во текот на производниот процес на парентералните дозирани форми

Тестирањето во текот на производниот процес (*in-process* тестирање) претставува клучен елемент во контролата на квалитетот при производство на парентералните дозирани форми. Овој тип тестирање овозможува брза проверка дали концентрацијата на активната супстанција во растворот се движи во рамките на спецификациските граници. Дополнително, се користи за оценка на хомогеноста на растворот преку земање примероци од горниот, средниот и долниот дел на садот, со цел да се потврди воедначената распределба на активната супстанција.

Вообичаено за оваа цел се користи UV/Vis спектроскопија, која е погодна за брзо тестирање на активната супстанција. Нејзината главна предност е краткото време на изведба (само неколку минути), што ја прави значително побрза во споредба со методите базирани на HPLC. Дополнително, UV/Vis спектроскопијата не бара скапа и сложена опрема, ниту, пак, компјутерски системи за обработка на податоци, што овозможува нејзина практична примена во реални производствени услови.

Сепак, развојот на спектроскопски метод може да претставува предизвик. Брановата должина што се користи за детекција кај HPLC методите не секогаш е соодветна за методите базирани на UV/Vis спектроскопија. Дополнително, UV/Vis методите, вообичаено, се помалку селективни од HPLC методите, па ексципиенсите во формулацијата можат да предизвикаат интерференции. На пример, бензил алкохол, кој често се користи како конзерванс, апсорбира на околу 260 nm, што може да се поклопи со апсорпцијата на активната супстанција. Во такви случаи може да се користат подолги бранови должини (вообичаено: > 300 nm) доколку активната супстанција има соодветна апсорпција во тој регион. Ако тоа не е возможно, се применува компензациски пристап преку израмнување на составот на примерокот и стандардниот раствор. Ова се постигнува со додавање плацебо во стандардниот раствор, така што апсорпцискиот придонес од ексципиенсите ќе биде идентичен во двата раствори. На овој начин интерференциите од ексципиентите се елиминираат и се овозможува прецизно мерење на концентрацијата на активната супстанција.

Овој вид тестирање претставува практичен и ефективен начин за контрола на квалитетот во реално време и игра значајна улога во обезбедувањето на интегритетот и безбедноста на готовиот производ.

7.6. Тестирање при пуштање на парентералните дозирани форми во промет

Контролата на квалитетот при пуштање на парентералните дозирани форми во промет опфаќа повеќе аналитички тестови со цел да се потврди нивниот состав, стабилност и безбедност.

I. Идентификација

Тестот за идентификација најчесто се заснова на појава на карактеристична боја при реакција со соодветен хемиски реагенс. На пример, фенолните соединенија со железо (III) хлорид даваат темна обоена реакција. Доколку не е возможна специфична обоена реакција, за идентификација се применуваат хроматографски методи (TLC или HPLC), при што ретенциското време на активната супстанција се споредува со она на референтниот стандард.

II. Определување на содржина

Методите базирани на HPLC се клучни за определување на содржината (јачината) на активната супстанција во готовиот производ, како и за детекција на деградациските продукти (Dorsey et al., 1998). Со други зборови, овие методи мора да бидат *stability-indicating*, односно да обезбедуваат јасно раздвојување на пикот на активната супстанција од пиковите на нејзините деградациски продукти, процесните онечистувања и ексципиенсите.

Вообичаено примероците се подготвуваат со прецизно одмерување на количината и соодветно разредување, најчесто со мобилната фаза. Кај бистри раствори оваа постапка е релативно едноставна, додека кај емулзии и суспензии потребни се дополнителни постапки, како филтрација или сонификација во ултразвучна бања за да се обезбеди бистар раствор погоден за анализа.

При изведба на хроматографска анализа концентрацијата на примерокот мора внимателно да се избере, така што резултатите од повеќекратни инјектирања ќе бидат конзистентни и репродуктивни, со вредност на RSD < 2%. Дополнително, за методот да се смета за соодветен, хроматографската резолуција треба да биде $\geq 1,5$, а факторот на капацитет < 10 (Adamovics, 1996). Паралелно со примерокот за анализа, се подготвува и стандарден раствор со иста концентрација и ист растворувач за да се обезбеди точна споредливост на резултатите.

За анализа на деградациските продукти често се користи примерок со повисока концентрација од онаа што се применува за определување на содржината на активната супстанција (Krstulovic & Lee, 1997). Со тоа се зголемува чувствителноста на методот и се овозможува полесна детекција на мали пикови што претставуваат деградациски продукти. Методот треба да има способност да ги детектира деградациските продукти во количини што претставуваат најмалку 0,05% од површината на пикот на активната супстанција (Chafetz, 1971). Доколку се достапни, се применуваат стандардни раствори за секој познат деградациски продукт. Во спротивно, како референт се користи активната супстанција. Секој непознат пик се споредува со соодветниот стандард, врз основа на што се определува неговиот релативен фактор на одговор (Krstulovic & Lee, 1997).

III. Проценка на процесни онечистувања и деградациски продукти

Особено внимание се посветува на процесните онечистувања, кои мора да бидат прецизно идентификувани преку нивните ретенциски времиња за да не се протолкуваат погрешно како деградациски продукти (ICH Q3B, 1996). Во одредени случаи една иста супстанција може истовремено да се класифицира и како процесно онечистување и како деградациски продукт, што дополнително ја усложнува проценката. Во вакви ситуации површината на пикот се коригира со одземање на количината што претходно е утврдена во активната супстанција, а преостанатиот дел се смета за деградациски продукт.

IV. Анализа на критични ексципиенси

Кај парентералните дозирани форми често се вклучуваат ексципиенси како млечна киселина, декстроза, натриум метабисулфит и бензил алкохол (Marbach & Well,

1967). Следењето на овие супстанции е задолжително, особено кај патентираните лекови, бидејќи нивното присуство и стабилност директно влијаат врз квалитетот, безбедноста и регулаторната усогласеност на производот.

Млечната киселина може да се определи со реверзна титрација, при што претходно се екстрахира активната супстанција преку јонска размена и третман со натриум хидроксид. Сепак, овој метод не е применлив во присуство на декстроза, бидејќи базната хидролиза доведува до формирање органски киселини. Како алтернатива се користи ензимски колориметриски метод, во кој млечната киселина се конвертира во пируват и водород пероксид, кој, пак, реагира за да формира обоена супстанција со максимум апсорпција на 540 nm (Marbach & Well, 1967; Barham & Trinder, 1972). Со овој модифициран метод млечната киселина може успешно да се определи во формулации, по претходна хидролиза на естерите на 100 °C.

Декстрозата најчесто се определува со полариметриски метод, освен во случаи кога активната супстанција е оптички активна. Тогаш се применуваат HPLC методи со детектори базирани на индекс на прекршување или на расејување на светлината, иако овие техники претежно се користат за истражувачки цели. Декстрозата е чувствителна на термичка деградација, особено за време на терминалната стерилизација, при што се формира нејзиниот главен деградациски продукт – 5-хидроксиметилфурфурал (5-HMF) (Ulbricht et al., 1984). Овој продукт, заедно со сродните супстанции, се следи на бранова должина од 284 nm, со максимално дозволена апсорпција од 0,25 единици на 280 nm (USP, 2000c). Иако 5-HMF не е токсичен во рамките на пропишаните граници, неговото присуство може да влијае врз точноста на анализите поради преклопување на UV/Vis апсорпцијата.

Метабисулфитот најчесто се анализира преку оксидација со јод, по што следува титрација со натриум тиосулфат. Овој метод може да се спроведе рачно, со скроб како индикатор, или автоматизирано, со потенциометриска детекција.

V. Дополнителни параметри

- *pH вредност* – се мери потенциометриски, по претходна стандардизација на мерачот со два пуферски раствора кои ја опфаќаат очекуваната pH вредност. Разликата меѓу pH вредностите на овие два пуферски раствора не смее да надминува четири единици;
- *осмоларност/осмолалност* – овој параметар претставува физичко својство што зависи од вкупниот број растворени честички во растворот и се изразува во милиосмоли на литар. Најчесто се определува со осмометар, преку мерење на намалувањето на точката на мрзнење на растворот. За да се потврди соодветноста на формулацијата, експериментално добиените вредности се споредуваат со теоретски пресметаните.

7.7. Тестирање на суровините што влегуваат во состав на парентералните дозирани форми

Пред употреба на која било активна супстанција во производниот процес, задолжително се спроведува тестирање на нејзиниот идентитет, чистота и содржина, со цел да се потврди нејзината соодветност за примена во готовите производи. Ова тестирање е суштински дел од системот за контрола на квалитет во фармацевтската индустрија.

Најчесто активната супстанција се анализира со HPLC, особено кога е потребно да се потврди нејзиниот идентитет и содржина, како и да се проценат присутните онечистувања. Доколку не е достапен соодветен референтен стандард, содржината може алтернативно да се определи со титриметриски метод. Од практична гледна точка препорачливо е да се примени сличен HPLC метод и за активната супстанција и за готовиот производ, со минимални разлики во подготовката на примерокот.

Клучно барање за аналитичкиот метод е селективноста, односно способноста јасно да се разграничи пикот на активната супстанција од пиковите на процесните онечистувања и деградациските продукти (Sievert & Drouen, 1993; Andrews & Richardson,

1994). Дополнително, методот мора да обезбеди доволна чувствителност за детекција на траги од онечистувања во концентрации до 0,05% во однос на површината на главниот пик. При примена на истиот метод за тестирање на стабилноста, неопходно е процесните онечистувања да бидат прецизно дефинирани за да не се протолкуваат погрешно како деградациски продукти. Сепак, може да се појават случаи во кои една иста супстанција истовремено се јавува и како процесно онечистување и како продукт на деградација.

Во HPLC методологијата препорачливо е да се применуваат различни концентрации на примерокот, зависно од целта на анализата. Пониска концентрација се користи при определување на содржината на активната супстанција, додека повисока концентрација е погодна за идентификација и квантификација на процесните онечистувања. Високата концентрација овозможува подобар сигнал–шум однос и обезбедува репродуктивни резултати при мерење на површината на пиковите на онечистувањата. Сепак, таа не е соодветна за прецизно определување на содржината на активната супстанција, бидејќи ја нарушува формата на главниот пик. Поради тоа неопходно е користење на поразреден примерок.

Кога стандардите за онечистувањата се достапни само во ограничени количини, се применуваат релативни фактори на одговор (RRF), со чија помош концентрацијата на онечистувањата се изразува во однос на одговорот на активната супстанција. Иако RRF вредностите можат теоретски да се пресметаат спектроскопски, врз основа на моларната апсорптивност, во практиката најточни резултати се добиваат преку HPLC, со директна споредба на површините на пиковите на онечистувањата и на активната супстанција.

За полуквантитативна анализа на онечистувањата во суровините можат да се применат и методи базирани на TLC. Во својата наједноставна форма проценката се врши визуелно, преку споредба на големината и интензитетот на дажките. За да се постигне поголема точност можат да се користат дензитометрија и флуоресцентна анализа, а во одредени случаи дажките може да се изолираат и дополнително да се анализираат со спектроскопски техники.

Остатоците од органски растворувачи претставуваат критичен параметар во контролата на суровините и најчесто се испитуваат со GC. Испитувањето мора да ги опфати сите растворувачи што се користат во производниот процес (како, на пример, бензен, хлороформ, 1,4-диоксан, метилен хлорид и трихлоретилен), како и други потенцијално присутни испарливи органски соединенија. Доколку производителот обезбеди веродостојна документација дека одредени растворувачи не се применуваат во производниот процес и, како резултат, не можат да бидат присутни во готовиот производ, тестирањето за тие соединенија може да се изостави.

Дополнително, за активните супстанции задолжително се спроведуваат и фармакопејски тестови, кои вклучуваат определување содржина на вода, остаток при жарење, како и присуство на хлориди, сулфати и тешки метали.

Современа аналитичка техника што добива сè поголема примена е NIR спектроскопијата, која се користи за брзо и недеструктивно тестирање на суровини при добивање интермедиерни и готови производи. Принципот на техниката се заснова на апсорпција на електромагнетно зрачење во блискиот инфрацрвен регион (800 – 2500 nm), при што хемиските врски во функционалните групи на испитуваната супстанција влегуваат во карактеристични вибрации. Количината и положбата на апсорпцијата се поврзани со бројот и видот на овие групи, па со анализа на добиениот спектар се добиваат информации за квалитативниот и квантитативниот состав на примерокот.

NIR спектроскопијата е погодна за анализа на прашоци, течности и емулзии, без претходна подготовка, а мерењата можат да се спроведат директно во оригиналната амбалажа, во рефлектантен или трансмисионен модус. Резултатите се добиваат за помалку од една минута. Главните предности на оваа техника се брзината на анализа, елиминирањето на потребата од подготовка на примерокот и намалената веројатност за грешки, со што се зголемува прецизноста на мерењата, без да се наруши точноста. Поради овие предности NIR спектроскопија денес се смета за соодветна алтернатива на традиционалните хроматографски и спектроскопски техники.

7.8. Микробиолошко тестирање на парентералните дозирани форми

Парентералните дозирани форми претставуваат посебна категорија фармацевтски производи за кои важат најстроги барања во однос на микробиолошката чистота. За разлика од другите дозирани форми, тие мора да бидат:

- *стерилни* – целосно ослободени од живи микроорганизми, вклучувајќи ги и нивните вегетативни и спорогени форми;
- *апирогени* – без присуство на пирогени материи, особено бактериски ендотоксини;
- *ослободени од туѓи честичи*.

Обезбедувањето на овие параметри претставува сериозен технолошки и регулаторен предизвик за производителите и лабораториите за контрола на квалитет. Успешното производство бара интегриран пристап кој вклучува специјално дизајнирани и квалификувани производни капацитети (чисти простории, асептични зони), адекватна опрема и добро дефинирана програма за микробиолошко тестирање, мониторинг и контрола.

Микробиолошкото тестирање има суштинска улога во сите фази на производството и контролата на квалитетот. Тоа не се однесува само на готовиот производ, туку се спроведува на сите сировини што влегуваат во неговиот состав – активната супстанција и ексципиентите. Во текот на производниот процес микробиолошкиот мониторинг опфаќа контрола на производната околина и на персоналот кој работи во асептични услови со цел да се обезбеди континуирана заштита на производот од микробиолошка контаминација.

Граничните вредности за дозволена микробиолошка контаминација се прецизно утврдени во фармакопејските и регулаторните стандарди и мора строго да се почитуваат. Тие се дефинираат врз основа на видот на производните активности, степенот и времетраењето на изложеност на производот на производната околина, како и применетиот метод на стерилизација (терминална стерилизација или асептична постапка).

Еден од најважните начини за верификација на асептичната постапка е тестот за полнење со хранителна подлога (*media fill test*). Во овој тест, под реални производни услови, оригиналната амбалажа наместо со парентерален раствор се полни со течна хранителна подлога. На тој начин се врши конечна проверка на ефикасноста на мерките за контрола на микробиолошката контаминација. Дополнително, со помош на овој тест се потврдува валидноста на вентилационите и климатизационите системи, соодветната обука и хигиена на персоналот, како и правилното спроведување на асептичните постапки.

За валидација на опремата за стерилизација, како што се: стерилизатори на пара (автоклави), тунели за стерилизација и депирогенизација, печки за стерилизација и машини за миење, задолжително се користат биолошки индикатори. Дополнително, се спроведуваат тестови за предизвикување контаминација со микроорганизми, со кои се проверува интегритетот на филтрите, стерилните затворачи и другите критични компоненти на системите.

7.9. Тест за стерилност на парентералните дозирани форми

Кога станува збор за парентералните дозирани форми, од суштинско значење е нивната етикета јасно да укажува дека производот е стерилен. Теоретски, стерилноста претставува апсолутна состојба, односно целосно отсуство на живи микроорганизми. Во практична смисла, пак, термините „стерилен производ“ или „стерилна серија“ подразбираат дека производот бил подложен на официјално признат тест за стерилност (како, на пример, тестот дефиниран во USP, Ph. Eur., или, пак, друг фармакопејски стандард) и дека резултатите потврдиле прифатливо ниво на стерилност.

Сепак, тестот за стерилност не е самостоен доказ за стерилност. Тој претставува дел од поширок систем на контрола и се спроведува во комбинација со други мерки, како што се валидирана асептична постапка, континуиран мониторинг на производната

околина и персоналот, строга контрола на суровините и соодветна обука на операторите. Само со интегрирање на овие активности може оправдано да се користи терминот „стерилен производ“.

7.9.1. Природа и ограничувања на тестот за стерилност

Тестот за стерилност е деструктивен, што значи дека единиците избрани за анализа не можат понатаму да се користат. Оттука, не е возможно да се испита секоја единица од производната серија. Наместо тоа, се тестира репрезентативен примерок (подмножество) од серијата, врз основа на кој се донесуваат заклучоци за стерилноста на целата серија. Ова ограничување претставува еден од најголемите недостатоци на тестот, бидејќи носи одреден статистички ризик. На пример, доколку 1% од единиците во серијата се нестерилни, веројатноста за откривање на контаминација при тестирање на 20 примероци изнесува само околу 18%.

Дополнителен предизвик претставува можноста за појава на лажно позитивни резултати, најчесто како последица на лабораториска контаминација или неправилно ракување. Затоа, од суштинско значење е примената на највисоки стандарди за асептична постапка и обезбедување темелна обука на аналитичкиот персонал.

И покрај овие ограничувања, тестот за стерилност е задолжителен согласно официјалните фармакопејски и регулаторни барања, вклучувајќи ги USP <71>, CFR 21 Part 211.167 (САД) и водичот на FDA за асептични постапки (1987).

7.9.2. Методи за изведба на тестот за стерилност

Фармакопеите пропишуваат два основни метода за изведба на тестот за стерилност:

I. Метод на директна инокулација (*direct inoculation/direct transfer*)

Овој метод вклучува асептичен трансфер на примерокот директно во течна хранителна подлога, најчесто течен тиогликолат или соја-казеин. Пред неговата примена задолжително е да се провери дека самиот производ не го инхибира растот на индикаторските микроорганизми (како, на пример, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*). Во спротивно, резултатите би биле лажно негативни.

Иако концептуално едноставен, методот бара висока техничка прецизност, бидејќи повеќекратните манипулации и потребата за работа исклучиво во асептични услови ја зголемуваат можноста за човечки грешки и лабораториска контаминација. Затоа, овој метод се применува главно тогаш кога природата на производот не дозволува примена на методот на мембранска филтрација.

II. Метод на мембранска филтрација (*membrane filtration*)

Методот на мембранска филтрација претставува метод од избор за тестирање на стерилност на парентералните дозирани форми и се применува секогаш кога природата на производот го дозволува тоа. Принципот се заснова на пропуштање на испитуваниот раствор низ стерилен мембрански филтер (најчесто со големина на пори од 0,45 μm), при што сите евентуално присутни микроорганизми се задржуваат на неговата површина.

По филтрацијата филтерот се испира со стерилен дилуент, заради две основни цели:

- да се овозможи микроорганизмите што се задржале во порите или на површината на филтерот да останат витални и рамномерно распределени за полесно да дојдат во контакт со хранителната подлога;
- да се отстранат или разредат евентуалните инхибиторни супстанции од производот кои би можеле да го попречат растот на микроорганизмите.

На крај, филтерот се пренесува во хранителната подлога и се инкубира под соодветни услови (температура и време) за да се овозможи раст и развој на евентуално присутните микроорганизми.

Во индустриската практика сè почесто се користат комерцијално достапни, претходно стерилизирани и затворени системи за филтрација. Нивната примена овозможува побрза и посигурна изведба на методот, со зголемена ефикасност и значително намален ризик од контаминација.

7.9.3. Хранителни подлоги за изведба на тестот за стерилност

Во согласност со фармакопејските упатства за изведба на тестот за стерилност се користат две основни хранителни подлоги:

I. Течен тиогликолатен медиум (*Fluid Thioglycollate Medium – FTM*)

Иако е класифициран како течен медиум, FTM содржи мало количество агар (0,75 g/L), што му дава полуцврста конзистенција и ја ограничува дифузијата на кислород од површината. Во неговиот состав се вклучени натриум тиогликолат и L-цистеин, кои делуваат како редуцирачки агенси и создаваат средина со ниско ниво на кислород, особено во долниот дел од садот. На тој начин FTM овозможува раст на микроорганизми кои не преживуваат во строго аеробни услови, односно е наменет за детекција на анаеробни и аеротолерантни микроорганизми.

Покрај основната формулација, постојат и модифицирани варијанти што се користат во специфични случаи. На пример, при испитување на стерилноста на маслени производи или емулзии, во медиумот се додава полисорбат 80, кој овозможува подобра дисперзија на хидрофобните компоненти.

II. Соја-казеин дигестивен медиум (*Soybean-Casein Digest Medium – SCDM*)

Овој медиум се користи за детекција на аеробни бактерии и габи, Тој овозможува раст на широк спектар микроорганизми, меѓу кои грам-позитивни и грам-негативни бактерии, како и мувли и квасци. SCDM претставува општ медиум за детекција на најчесто присутните контаминанти во стерилни производи.

Хранителните подлоги за изведба на тестот за стерилност може да се подготват во лабораторија од поединечни хемиски соединенија или да се набават комерцијално во две форми:

- како готови стерилни раствори, спакувани во соодветни рецепиенти;
- како дехидрирани прашоци, кои се рехидрираат и стерилизираат непосредно пред употреба.

Дехидрираните прашоци имаат подолг рок на траење и се поекономични во споредба со готовите стерилни раствори.

Кога се испитува стерилност на производи што содржат антибиотици (како, на пример, пеницилини или цефалоспорини), хранителните подлоги се модифицираат со додавање на ензимот β -лактамаза. На тој начин антибиотикот се инактивира и се елиминира неговото инхибиторно дејство врз растот на евентуално присутни микроорганизми. Количината на ензимот се утврдува експериментално, во согласност со специфичните својства на антибиотикот.

7.9.4. Број на примероци за изведба на тестот за стерилност

Бројот на примероци за изведба на тестот за стерилност зависи од три клучни фактори:

- вкупниот број единици во производствената серија;
- зафатнината (волуменот) на поединечните садови;
- применетиот метод на стерилизација.

Вообичаено за тестирање се земаат од 10 до 20 единици по случаен избор. Доколку серијата содржи од 20 до 200 единици, се тестираат 10 единици, а доколку содржи повеќе од 200 единици – 20 единици.

Иако овие вредности претставуваат општоприфатени стандарди, бројот на примероци може да варира во зависност од природата на производот и специфичните регулаторни барања. Затоа секогаш е неопходно да се следат упатствата наведени во официјалните фармакопеи (USP, Ph. Eur., JP) кои содржат детални препораки и табели за прецизно одредување на големината на примерокот.

7.9.5. Време и температура на инкубација за изведба на тестот за стерилност

Според USP, времето и температурата на инкубација при изведба на тестот за стерилност зависат од видот на хранителната подлога што се користи.

SCDM се инкубира на температура од 20 – 25 °C, додека FTM на 30 – 35 °C. Повисокиот температурен опсег одговара на човечката телесна температура и овозможува оптимален раст на мезофилни микроорганизми, особено оние со потекло од човекот, како микрококи и стафилококи од кожната флора. Од друга страна, микроорганизмите што потекнуваат од околината (како мувли, квасци и бацили) имаат оптимален раст при нешто пониски температури, што ја оправдува потребата од два температурни опсега.

Во однос на времето на инкубација, кај производите добиени со асептична постапка (т.е. терминално нестерилизирани) таа мора да трае најмалку 14 дена за да се обезбеди детекција на бавнорастечки или оштетени но сè уште одржливи микроорганизми. Кај терминално стерилизираните производи, пак, времетраењето на инкубацијата може да се скрати на најмалку 7 дена, доколку се применува методот на мембранска филтрација. Овие барања се воспоставени за да се обезбеди сигурна детекција на сите потенцијално присутни микроорганизми, вклучувајќи ги и оние што покажуваат забавен или отежнат раст.

7.9.6. Интерпретација на резултатите од тестот за стерилност

Интерпретацијата на резултатите од тестот за стерилност се темели на едноставно правило: во епруветите со хранителна подлога не смее да се појави заматеност која претставува доказ за раст на микроорганизми. Значи, отсуството на ваква заматеност укажува дека тестираниот примерок е стерилен.

Доколку во која било од епруветите се појави микробиолошки раст, резултатот се смета за неуспешен и укажува дека серијата можеби не е стерилна. Повторување на тестот е дозволено само доколку постојат валидни и документирани докази дека првичниот резултат бил последица на лабораториска грешка или случајна контаминација. Ако и повторениот тест покаже раст, резултатот се смета за конечен и серијата мора да биде отфрлена. Овој став е јасно нагласен и во водичот на FDA за асептични постапки од 1987 година, каде се наведува: *„Кога нема цврсти докази за лабораториска грешка или кога достапните информации се неубедливи, производителите треба да постапат во корист на безбедноста и да ја отфрлат целата серија како несоодветна за барањата на стерилност.“*

Во случај на неуспешен тест за стерилност, неопходно е да се спроведе сеопфатно истражување, кое опфаќа:

- проверка на сите лабораториски активности и на условите на тестирање;
- анализа на производната околина;
- проверка на опремата користена при производство и пакување.

Идентификацијата на микроорганизмите детектирани во контаминирани примероци е задолжителна, бидејќи обезбедува клучни информации за можниот извор и начинот на контаминација.

Тестот за стерилност не се применува само на парентералните дозирани форми, туку и на масти, кремове, цврсти супстанции, како и на стерилни медицински средства и уреди.

7.10. Проценка на биооптоварување кај парентерални дозирани форми

Терминот биооптоварување (*bioburden*) се однесува на бројот микроорганизми што може да се детектираат на површина, предмет или во раствор. Во контекст на парентералните дозирани форми, тоа го претставува вкупното присуство на микроорганизми во растворот кој се користи во производниот процес, пред неговата стерилизација. Оваа проценка има клучно значење за: контрола на квалитетот, оценка на хигиенските практики и мониторинг на условите во производната околина.

Проценката на биооптоварувањето кај парентералните раствор се врши со примена на компендијални методи, како што е тестот за микробно броење (USP < 6 >) или негов соодветен еквивалент. Овие методи опфаќаат вкупно броење аеробни бактерии, како и броење квасци и мувли. Кога се очекува ниско ниво на микробиолошка контаминација, како што е случај кај производи добиени под строги асептични услови, може да се примени модифициран метод на мембранска филтрација. Овој пристап овозможува испитување на поголеми волумени раствор, со што се зголемува чувствителноста на методот и се подобрува веродостојноста на резултатите.

Во пракса тестирањето најчесто се спроведува на нефилтрираниот раствор во голем волумен. На тој начин се добива реална слика за вкупната микробиолошка контаминација што може да настане како резултат на различни фактори: квалитетот на суровините, различните манипулации, условите во околината и влијанието на опремата. Дополнително понекогаш се испитува и филтрираниот раствор (пред или по полнењето), особено кога тоа се бара од европските инспекциски органи или, пак, за споредба со резултатите добиени од нефилтрираниот раствор.

Микроорганизмите изолирани при тестирањето на биооптоварувањето треба, доколку е возможно, целосно да се идентификуваат. Оваа постапка е особено важна за откривање на можниот извор на контаминација, следење на патиштата на микробиолошка контаминација и навременото спроведување соодветни корективни мерки во рамките на контролата на квалитетот.

Проценката на биооптоварувањето по завршената формулација овозможува утврдување на ефикасноста на контролите врз суровините, производната околина и самите операции. Врз основа на добиените резултати се проценува соодветноста на методите за терминална стерилизација, како што се: стерилна филтрација, асептично полнење или топлинска стерилизација. Дополнително, овие податоци се користат за потврда и/или валидирање на максималниот период на безбедно чување на нефилтрираниот раствор пред завршната стерилизација, без да се загрози неговиот квалитет и стерилност.

Особено внимание треба да се посвети на резултатите што укажуваат на зголемен број грам-негативни бактерии поради нивниот потенцијал за ослободување ендотоксини. Иако микроорганизмите, заедно со нивните спори, може успешно да се отстранат со стерилна филтрација (0,2 µm), ендотоксините остануваат во растворот и претставуваат сериозен ризик за безбедноста на лекот. Затоа континуираното следење на биооптоварувањето е од суштинско значење за обезбедување микробиолошка безбедност и зачувување на интегритетот на парентералните дозирани форми.

7.10.1. Земање примероци за проценка на биооптоварување кај парентерални дозирани форми

Земањето примероци од нефилтрираниот раствор за проценка на биооптоварувањето мора да се изведува во строго асептични услови, со цел да се спречи дополнителна контаминација. За таа цел се користат стерилни садови и/или специјализирани уреди за земање примероци.

Примероците се земаат согласно однапред дефиниран и валидиран план, по завршување на формулацијата и сите фази на мешање на растворот. За да се намали ризикот од вештачка контаминација за време на постапката, препорачливо е активноста да ја извршуваат обучени микробиолози од одделот за контрола на квалитет. Сепак, со соодветна обука и валидирани процедури, таа може да биде доверена и на оператори од одделот за производство.

Во зависност од конфигурацијата и типот на резервоарот, за земање примероци може да се користат специјализирани уреди. Најчесто доволен е едноставен, претходно стерилизиран Y-конектор, приклучен на долниот излезен вентил, кој овозможува сигурно и асептично земање примероци.

Потребно е однапред да се дефинира временски интервал во кој земените примероци мора да се достават до лабораторијата за контрола на квалитет. Доколку анализата не може да се изврши веднаш, примероците треба да се чуваат под контролирани услови (на пример, на пониска температура и во ограничен временски интервал), бидејќи пролонгираното чување може да влијае врз точноста и валидноста на резултатите.

Само со ваков пристап се обезбедуваат точни, репрезентативни и доверливи резултати при проценка на биооптоварувањето.

7.10.2. Тестови за микробно броење според USP

Тестовите за микробно броење, опишани во USP < 61 >, обезбедуваат стандарди и методи за квантитативна проценка на одржливи аеробни микроорганизми во активни супстанции, суровини, интермедиерни производи и готови дозирани форми. Тие служат како основа за проценка на биооптоварувањето и микробиолошката чистота на производите.

Бидејќи различни фармакопеи, како Ph. Eur. и JP, може да содржат одредени методолошки разлики, секогаш е препорачливо да се консултира соодветната фармакопеја за да се обезбеди усогласеност на применетите постапки.

Тестовите за микробно броење опфаќаат неколку клучни аспекти:

- **Вкупен број аеробни бактерии (Total Aerobic Count – TAC):** одредување на бројот на колонии на одржливи аеробни бактерии;
- **Вкупен број квасци и мувли (Total Yeast and Mold Count – TYMC):** проценка на бројот на квасци и мувли;
- **Тестирање на индикаторски микроорганизми:** откривање специфични видови кои служат како индикатори за загадување со фекално потекло или друга критична контаминација.

Овие тестови, познати и како вкупно броење на одржливи микроорганизми, овозможуваат проценка на микробиолошката чистота на различни фармацевтски производи, вклучувајќи го и нефилтрираниот раствор во голем волумен. Крајната проценка на биооптоварувањето се добива со комбинирање на резултатите од TAC и TYMC, кои заедно го прикажуваат вкупниот број микроорганизми присутни во примерокот.

7.10.3. Определување на TAC и TYMC со метод за броење плочи

Квантитативното определување на биооптоварувањето во фармацевтските производи може да се изведе со повеќе микробиолошки методи. Најчесто се применуваат:

- **метод на броење плочи** (*pour plate method*);
- **метод на мембранска филтрација** (*membrane filtration method*);
- **турбидиметриски метод во течна хранителна подлога** (*multiple-tube method*), кој најчесто се користи за определување на TAC.

Во пракса TAC и TYMC најчесто се определуваат со методот на броење плочи, бидејќи тој е едноставен и погоден за примероци со ниско ниво на биооптоварување.

Најпрво се земаат 10 g, 10 mL или 10 единици од испитуваниот производ и се суспендираат во соодветен волумен SCDM или лактозен медиум, така што конечниот волумен изнесува 100 mL. На овој начин се обезбедува рамномерна дисперзија на микроорганизмите од примерокот. Од добиената суспензија се одвојуваат аликвоти и се инокулираат во четири стандардни петриеви плочи. Две од нив се користат за

определување на ТАС, а другите две за ТУМС. Во плочите за ТАС се додаваат по 15 - 20 mL стопен, но претходно изпаден соја-казеин дигестивен агар, додека во плочите за ТУМС се додава ист волумен стопен Сабуро декстрозен агар, кој служи како селективна хранителна подлога за квасци и мувли.

Откако примерокот и хранителната подлога добро ќе се измешаат, петриевите плочи се оставаат да се зацврстат, а потоа се инкубираат на соодветни услови. За ТАС инкубацијата се врши на температура од 30 – 35 °C во тек на 3 – 5 дена, додека за ТУМС се користи температура од 20 – 25 °C во тек на 5 – 7 дена. По завршување на инкубацијата се пребројуваат формираните колонии, а резултатите се изразуваат како број на колонии по g, mL или поединечна единица од испитуваниот производ.

7.10.4. Воспоставување граници за биооптоварување

Производителите на парентерални дозирани форми се должни да утврдат граници за биооптоварување на нефилтрираниот раствор што се користи во производството. Овие граници се дефинираат врз основа на интерни податоци добиени од претходно спроведени испитувања и служат за обезбедување континуирана микробиолошка контрола на производниот процес.

Вообичаено, потребно е да се воспостават две нивоа граници:

- *Граница на предупредување* – означува вредност на биооптоварување што укажува на потреба од зголемена внимателност и евентуална дополнителна анализа, но не бара веднаш примена на корективни мерки;
- *Граница на дејствување* – претставува критично ниво на микробиолошка контаминација, чиј надминат праг задолжително бара спроведување корективни мерки, како што се повторна евалуација на серијата или нејзино отфрлање.

Поставените граници може да варираат во зависност од типот на производот. На пример, терминално стерилизираните производи, вообичаено, имаат повисоки дозволени граници отколку оние подготвени во асептични услови. При нивното утврдување, исто така, се зема предвид присуството или отсуството на конзерванси во формулацијата, како и потенцијалот на одредени ексципиенси да го стимулираат растот на микроорганизми.

Кога за одреден производ нема достапни податоци за биооптоварување, вообичаена пракса е воспоставување основни (референтни) вредности. Тие најчесто се добиваат во фазата на развој или за време на валидација на производниот процес, користејќи ги условите и опремата што одговараат на финалното сериско производство.

За производи наменети за пазарот на Европската Унија мора строго да се почитуваат регулаторните барања. Европските тела придаваат особено значење на резултатите од тестирањето на нефилтрираните раствори, дури и кога станува збор за производи што потоа се подложуваат на терминална стерилизација. Според актуелната пракса максималното дозволено ниво на биооптоварување за нефилтриран раствор изнесува 10 CFU/100 mL за производи подготвени во асептични услови и 100 CFU/100 mL за терминално стерилизирани производи. Овие граници не смеат да бидат надминати во текот на целиот предвиден рок на употреба. Дополнително, може да се побара и тестирање примероци земени по филтрација, но пред стерилизација, со цел да се потврди нивото на биооптоварување непосредно пред финалниот чекор на стерилизација.

За ефективен надзор на микробиолошката контаминација производителите треба да воспостават систем на континуирана анализа на резултатите од тестирањето на биооптоварувањето. Таквиот систем овозможува следење и евиденција на резултатите за секој производ поединечно и обезбедува навремена детекција на потенцијални отстапки. Анализата најчесто ја спроведува интердисциплинарен тим кој врши редовни прегледи, вообичаено, на квартално или полугодишно ниво.

Секое идентификувано зголемување на биооптоварувањето, дури и ако е во рамките на дефинираните граници, треба веднаш да се испита со цел навремена детекција и елиминација на потенцијалната причина, пред да ескалира во посериозен проблем.

8. ИНОВАТИВНИ СИСТЕМИ ЗА ИСПОРАКА НА ЛЕКОВИ

Фармацевтските производи претставуваат практично и економично средство за лекување широк спектар на заболувања. Една од нивните најголеми предности е тоа што примената во голем број случаи е едноставна и не бара постојан медицински надзор. Пациентите можат самостојно да ги администрираат лековите, особено оние наменети за орална или топикална употреба, што значително ја зголемува нивната достапност и го олеснува вклучувањето во секојдневната клиничка пракса. Меѓутоа, зад оваа привидна едноставност стои сложен и систематски труд на фармацевтските научници кои се одговорни за формулирање на лековите на начин што гарантира стабилност, биорасположливост и безбедност. Притоа тие постојано се стремат кон оптимизација на системот за испорака и максимизирање на ефикасноста на активната супстанција. Испораката на лекот претставува суштински елемент во развојот на секој фармацевтски производ и мора да биде внимателно планирана, паралелно со проценката на терапевтската ефикасност и потенцијалните несакани ефекти.

Најчесто користениот начин на администрација на лековите е преку гастроинтестиналниот тракт: орално (преку уста) или ректално. Покрај овие, постојат и други неинвазивни патишта погодни за самостојна употреба, како што се назалната, дермалната и очната администрација. Овие начини се особено популарни поради нивната едноставност и удобност за пациентите.

Од друга страна, инвазивните методи (како интравенска, интрамускулна, поткожна и перитонеална администрација) бараат соодветна стручна подготовка и најчесто се изведуваат од страна на квалификуван медицински персонал. Иако овие пристапи се посложени, тие се незаменливи во ситуации кога е потребна брза, контролирана или таргетирана испорака на лекот во системската циркулација.

Во последните децении развојот на иновативни системи за испорака на лекови значително напреднува со цел да се подобри прецизноста, ефикасноста и безбедноста на терапијата. Современите технологии овозможуваат контролирано ослободување на активните супстанции, насочување кон специфични ткива или органи, како и намалување на несаканите системски ефекти. Со тоа се отвора пат кон персонализирана медицина и современи стратегии на лекување кои се прилагодени на индивидуалните потреби на пациентот.

8.1. Орална и гастроинтестинална испорака на лекови

Оралната администрација претставува еден од најчестите и најудобни начини за администрација на лекови во човековиот организам. Апсорпцијата на активни супстанции администрирани преку овој пат се одвива во различни делови од гастроинтестиналниот тракт, како што се: усната шуплина, желудникот, тенкото црево, дебелото црево и ректумот. Од сите овие делови, тенкото црево е најзначајното место за апсорпција поради неговата голема апсорптивна површина, богатата васкуларизација и присуство на ензими кои ја олеснуваат и забрзуваат ресорпцијата. По апсорпцијата, лековите преку порталната вена се пренесуваат до црниот дроб каде што се подложуваат на метаболизам на прв премин (*first-pass effect*), пред да навлезат во системската циркулација и да стигнат до местото на дејство. Овој метаболички процес, заедно со хемиската деградација во киселата средина на желудникот и ензимската разградба низ гастроинтестиналниот тракт, претставува сериозен предизвик за постигнување адекватна биорасположливост на лекот.

Ниската орална биорасположливост може да произлегува од повеќе фактори: ниската растворливост на активната супстанција во вода, слабата пропустливост низ интестиналната мембрана или изразената метаболичка нестабилност. Поради овие ограничувања, одредени групи лекови (хормони, протеини, пептиди, антибиотици) не се погодни за класична орална администрација, освен ако не подложат на модификации (Mehrotra et al., 2023). Еден од пристапите за надминување на овие пречки е развојот на пролекови, кои претставуваат биолошки неактивни деривати што метаболички се активираат во цревата или црниот дроб, со што се подобрува нивната апсорпција и се зголемува биорасположливоста.

Дополнителна можност нуди и ректалната администрација на лекови, која овозможува делумно заобиколување на метаболизмот на прв премин. Имено, дел од венската дренажа од ректумот оди директно во системската циркулација. Овој пат е особено корисен кога е потребен брз терапевтски ефект или кога пациентот не е во можност да прима лекови орално.

Еден навистина иновативен пристап кон оралната испорака на лекови е развојот на капсули со далечинско управување. Станува збор за минијатурен уред (со волумен помал од 1 mL), кој има внатрешна и надворешна обвивка со мали отвори, распоредени на таков начин што првично не се преклопуваат. По голтањето на капсулата од страна на пациентот, надворешна електронска стимулација предизвикува порамнување на отворите, со што се овозможува прецизно и таргетирано ослободување на активната супстанција на одредено место во гастроинтестиналниот тракт. За следење на транзитот на капсулата низ дигестивниот систем се применуваат радионуклиди (индиум-111 и технециум-99m), а движењето се визуелизира со γ -сцинтиграфија. Истражувањата покажуваат дека капсулата во просек останува во желудникот околу 1,5 час, додека целосниот транзит низ гастроинтестиналниот тракт кај возрасни лица трае приближно 30 часа. Ова овозможува контролирано и таргетирано ослободување на активната супстанција во различни делови на дигестивниот тракт: желудник, проксимално или дистално тенко црево, дебело црево.

Овој напреден пристап отвора нови перспективи за персонализирана и таргетирана терапија, особено во случаи кога е потребно контролирано, постепено или продолжено ослободување на активната супстанција од дозираната форма.

Табела 26. Предности и ограничувања на различни орални и гастроинтестинални системи за испорака на лекови (автор)

Бр.	Орален систем за испорака на лекови	Предности	Ограничувања
1	Стандардна таблета/капсула	Едноставна примена, економична	Ниска биорасположливост за некои лекови
2	Дозирана форма со контролирано ослободување	Подолготрајно ослободување, стабилни нивоа	Потребна е посебна технологија за формулација
3	Пролек	Подобра апсорпција и биорасположливост	Потребна активација, посложен метаболизам
4	Ректална администрација	Делумно избегнување на метаболизам на прв премин	Непријатност за пациентот, варијабилна апсорпција
5	Капсула со далечинско управување	Таргетирано и контролирано ослободување	Сложеност, повисока цена, потребна технологија

8.1.1. Испорака на лекови преку желудникот

Во терапијата на желудочни инфекции, особено оние предизвикани од *Helicobacter pylori*, постои изразена потреба од прецизна и континуирана испорака на антибиотици директно во желудникот. *Helicobacter pylori* е патоген кој има клучна улога во развојот на желудочен улкус, а неговото целосно искоренување бара локализирана и продолжена антибиотска терапија со лекови како тетрациклин и метронидазол.

Со цел ефикасно искоренување на овој патоген, создаден е специјализиран хидрофилен трислоен систем за испорака на лекови, кој комбинира три активни супстанции: бизмут, тетрациклин и метронидазол. Системот е збогатен со ексципиенси, како натриум бикарбонат, поли(етилен оксид) и лактоза, кои му даваат карактеристични функционални својства, од кои најзначајна е способноста за флотација во желудочната средина.

По администрацијата системот веднаш го ослободува бизмутот, додека тетрациклинот и метронидазолот се ослободуваат постепено, следејќи кинетика од нулти ред во период од 5 до 7 часа. Ова значи дека се ослободува константна количина активна супстанција по единица време, независно од концентрацијата што останала во системот.

Клучна карактеристика на овој систем е неговата изразена флотабилност: тој останува лебдечки повеќе од 30 минути по потопување во желудочната содржина и се задржува на површината сè додека не се ослободат целосно сите активни супстанции. Ова својство е од суштинско значење бидејќи го продолжува времето на задржување на системот во желудникот, спречува негово прерано празнење и овозможува постигнување зголемена локална концентрација на активните супстанции на местото на инфекцијата.

Ваквиот пристап претставува значаен напредок во третманот на желудочни инфекции и демонстрира како интелигентниот дизајн на фармацевтските системи може значително да ја подобри ефикасноста на терапијата.

8.1.2. Испорака на лекови преку дебелото црево

Дебелото црево претставува клучна целна локација за третман на одредени воспалителни заболувања, како што е Кроновата болест. Ова заболување се карактеризира со фокални и често трансмурални воспалителни промени кои можат да се појават по должината на тенкото и дебелото црево, а неретко се проследени и со екстраинтестинални манифестации. За да се обезбеди ефективна терапија, неопходен е развој на дозирани форми кои ќе овозможат селективно ослободување на активната супстанција исклучиво во дебелото црево, притоа избегнувајќи предвремено ослободување и апсорпција во желудникот или тенкото црево.

Еден од пристапите се заснова на употреба на полимерни материјали кои се нерастворливи во вода и остануваат хемиски стабилни во кисела и неутрална средина, но се подложни на редуктивна деградација во условите на дебелото црево. Такви полимери можат да се синтетизираат преку реакција помеѓу α, ω -диаминополиетер и ди-N-оксисукцинимидилестер на 3,3-дителидипропионска киселина. Добиениот полимер се применува како материјал за филм-обложување на пелети (сферични гранули) со активна супстанција. Типичен пример е кополимерот Eudragit E100.

Испитувањата кај здрави доброволци покажале дека времето на почетна разградба на полимерната обвивка изнесува помеѓу 7,7 и 10,1 часа по оралната администрација, при што распаѓањето најчесто се случува во проксималниот и трансверзалниот дел на дебелото црево. Присуството на храна значително го пролонгира овој период, што може да доведе до одложено ослободување на активната супстанција за повеќе од 5 часа по празнењето на желудникот, независно од тоа дали испитаниците биле гладни или сити. Овие податоци се добиени со секвенцијално сцинтиграфско снимање, коешто овозможува прецизно следење на движењето на дозираната форма низ гастроинтестиналниот тракт во текот на 24 часа.

Друг пример на систем за специфично ослободување во дебелото црево се јадрени зрна составени од микрокристална целулоза, Carborol и активна супстанција. Овие зрна се последователно обложени со два слоја: првиот (Eudragit RS30D или Aquascoat) е наменет за контролирано ослободување, а вториот (Eudragit L30D) претставува гастрорезистентна облога. Carborol, како pH-чувствително средство за врзување, бабри на pH вредност карактеристична за дебелото црево. Овој процес на бабрење доведува до нарушување на интегритетот на обвивката и иницира ослободување на активната супстанција.

Тестовите за растворливост потврдиле дека овие системи обезбедуваат бавно ослободување на активната супстанција при pH вредности пониски од 6,5, додека при pH вредности повисоки од 6,5 се постигнува брзо и ефикасно ослободување. Ваквата pH селективност овозможува прецизна и таргетирана испорака на активната супстанција во дебелото црево, што претставува клучен предуслов за успешна терапија на воспалителни заболувања на цревата.

Овие стратегии претставуваат современ пристап кон целно-насочена испорака на лекови, при што се искористуваат специфичните физиолошки карактеристики на гастроинтестиналниот тракт за да се обезбеди прецизно ослободување на активната супстанција на целното место на дејство.

8.2. Директна испорака на лекови

Назалната празнина (назалната слузница) и ректумот се сметаат за специфични и алтернативни патишта за директна испорака на лекови во системската циркулација. Преку нив активните супстанции може да се апсорбираат директно во крвотокот, заобиколувајќи го метаболизмот на прв премин, кој најчесто ја намалува биорасположливоста на лековите при орална администрација.

Истражувањата на овие патеки за испорака на лековите и понатаму се интензивираат, особено во контекст на биолошки лекови, вакцини, пептиди и протеини, кај кои оралната администрација е несоодветна поради нивната деградација во гастроинтестиналниот тракт. Директната испорака преку назалната празнина или ректумот се смета за ветувачка стратегија за постигнување брза и ефикасна системска апсорпција, со намалена варијабилност и подобрен терапевтски профил.

8.2.1. Испорака на лекови преку назалната празнина (назалната слузница)

Назалната администрација овозможува брза апсорпција благодарение на богатата васкуларизација на назалната слузница и тенкиот епителен слој. Затоа оваа патека е особено погодна за испорака на лекови кои треба да манифестираат брзо дејство, како што се антиепилептиците, аналгетиците и хормоните. Дополнително, современите истражувања го разгледуваат потенцијалот на назалната администрација како пат за таргетирана испорака на лекови кон централниот нервен систем, преку олфакторниот и тригеминалниот нервен пат.

Назалната администрација се покажува како ветувачка алтернатива за лекови што се применуваат во состојби каде што оралната или интравенската администрација е непогодна или неизводлива. Еден таков пример е употребата на ондансетрон (антагонист на 5-HT₃ рецепторите), кој се користи за превенција на гадење и повраќање предизвикани од хемотерапија (Hussain et al., 1999).

Во студија на машки стаорци од видот Sprague-Dawley ондансетронот бил администриран во доза од 1 mg/kg преку интравенски и назален пат. Резултатите покажале дека концентрацијата на ондансетрон во плазмата достигнало максимално ниво за само десет минути по назалната администрација, што укажува на брза и речиси целосна апсорпција преку назалната слузница. Концентрациско-временските профили за назалната и интравенската администрација биле слични, а полуживотот на елиминација речиси идентичен. Овие податоци потврдуваат дека назалниот пат на администрација е еднакво ефикасен како интравенскиот, но воедно и попрacticен за примена во специфични клинички случаи (Hussain et al., 1999).

За споредба, оралната апсорпција на ондансетрон кај луѓето изнесува околу 56%, а времето за постигнување на максимална концентрација е меѓу 1,0 и 2,1 часа, што е значително подолго во однос на назалната администрација.

Назалната патека на администрација се разгледува како ветувачки пат за испорака на генетска терапија, особено кај цистична фиброза – наследно заболување предизвикано од мутации во генот што го кодира CFTR протеинот, кој функционира како хлориден канал. Нарушениот транспорт на хлоридни јони резултира со акумулација на густ и вискозен секрет во респираторниот тракт, што доведува до хронични инфекции, прогресивно оштетување на белодробното ткиво и, во крајна линија, предвремена смрт. Во рамките на терапевтските истражувања се испитува испораката на ДНК што го содржи здравиот ген за CFTR протеинот, со цел да се овозможи експресија на функционален хлориден канал и да се надомести дефектот предизвикан од мутацијата. За оваа намена се користат аденовирусни вектори или комплекси од плазмид и липозом. Овие стратегии покажале ограничено, минливо корективно дејство врз генетскиот дефект. Сепак, поновите истражувања се насочени кон развој на катјонски

липидно-ДНК аеросолни формулации, со цел да се зголеми ефикасноста, трајноста и насоченоста на генетската терапија преку назалната патека на администрација.

Назалната патека на администрација, благодарение на богатата васкуларизација, тенкиот епител и директниот пристап до системската циркулација, се потврдува како практичен, неинвазивен и брз начин за испорака на лекови, особено во клинички случаи кога е неопходна итна интервенција или таргетирана терапија.

8.2.2. Испорака на лекови преку ректумот

Ректалната администрација претставува значајна алтернатива кога оралната администрација е оневозможена, како, на пример, при повраќање, губење на свест или гастроинтестинални нарушувања. Со овој пат лекот се внесува во ректумот, каде што дел од венската дренажа (особено преку долната и средната ректална вена) води директно во системската циркулација, заобиколувајќи го метаболизмот на прв премин во црниот дроб. Сепак, апсорпцијата преку ректумот е ограничена и варијабилна, најчесто поради физиолошките особености на ректумот и присуство на фецес.

Типичен пример е налбуфинот, опоиден аналгетик чија јачина изнесува околу 50–90% од јачината на морфиумот. Тој се применува за ублажување на умерена до силна болка, како што е онаа предизвикана од хируршки интервенции, трауми, рак, како и бубрежна или жолчна колика. Според податоци добиени од истражувања на експериментални кучиња, неговата орална биорасположливост е многу ниска – околу 6%, поради изразениот метаболизам на прв премин.

Сепак, кога налбуфин се администрира ректално во форма на пролек (налбуфин-3-ацетилсалицилат), биорасположливоста значително се зголемува, достигнувајќи околу 28%, што претставува четири до петпати повисока апсорпција. Дополнително било забележано дека полуживотот на налбуфинот во плазмата се продолжува по ректална администрација, што овозможува подолготраен аналгетски ефект.

Овој пример јасно го илустрира потенцијалот на ректалниот пат на администрација за оптимизирање на фармакокинетичките својства на лекови со неповолна орална биорасположливост. Во таа насока формулациите во форма на пролекови, кога се администрираат ректално, можат да обезбедат значителна корист кај пациенти кои не можат да примаат лекови орално или во клинички случаи кога е неопходна побрза и поефикасна системска апсорпција.

8.3. Дерматолошки системи за испорака на лекови

Кожата претставува важна патека за испорака на лекови поради нејзината лесна достапност и можноста за постигнување локален и системски терапевтски ефект. Сепак, нејзината улога како природна заштитна бариера значително го отежнува транспортот на лековите, што претставува сериозен предизвик за истражувачите и фармацевтските формулатори. За надминување на овие ограничувања развиени се различни физички и хемиски стратегии со цел зголемување на пропустливоста на кожата.

Од физичките стратегии за подобрување на трансдермалната испорака, најчесто применувани се *електропорација* (примена на кратки високонапонски електрични импулси), *фонофореза* (ултразвук) и *јонтофореза* (слаб електричен напон). Овие техники значително ги подобруваат параметрите како што се: времето на задржување на лекот, степенот на пенетрација и концентрацијата на лекот во кожата. Испитувањата на примероци од кожа на лабораториски стаорци без влакна и на човечки ткива покажале дека со примена на овие пристапи се постигнува значително подобрување на апсорпцијата.

Покрај физичките стратегии, развиени се и хемиски средства за зголемување на пропустливоста на кожата. Меѓу нив се издвојуваат *терпените*, *N-додецил-2-пиролидинонот*, *глицеризинот* и *етозомите*. Етозомите се фосфолипидни везикули модифицирани со кратковерижни алкохоли кои покажуваат извонредна способност за испорака на лекови во подлабоките слоеви на кожата. Тие овозможуваат пенетрација на молекули како тестостерон на длабочина до 240 μm , додека класичните липозоми достигнуваат само околу 20 μm . Дополнително, етозомите имаат висок капацитет за

инкапсулација, што овозможува испорака на поголеми количини активна супстанција. Иако овие пристапи се ефективни и за мали молекули, испораката на макромолекули, како протеини, олигонуклеотиди и ДНК, останува предизвик.

За таа цел развиени се микроигли со примена на напредни микротехнолошки процеси, како што се реактивно јонско гравирање, микрокалапирање и електрохемиска галванизација. Со овие техники се изработуваат шупливи силиконски или метални микроигли кои можат да ја пробијат бариерата на *stratum corneum* без да предизвикаат болка или механичко оштетување на подлабоките ткива. На тој начин микроиглите овозможуваат испорака на лекови со волумен и ефикасност споредливи со оние постигнати при употреба на традиционални игли (Kaushik et al., 1998).

Резултатите од *in vitro* испитувањата за транспорт, спроведени со термички обработен човечки епидермис во Францови дифузни комори, покажале дека апликацијата на шупливи силиконски микроигли доведува до значително зголемување на пропустливоста на кожата за модели на лекови како калцеин, инсулин и говедски серумски албумин. Добиената вредност на пропустливост изнесувала 10^{-1} cm/h, што е значително повисоко во споредба со пропустливоста на интактната кожа. Дополнителни *in vivo* испитувања, спроведени кај лабораториски стаорци без влакна, потврдиле дека администрацијата на инсулин преку микроигли доведува до значително намалување на нивото на глукоза во крвта, што укажува на ефективна системска апсорпција на лекот преку кожата.

Испитувањата кај здрави доброволци, пак, покажале дека апликацијата на микроиглите не предизвикувала болка, што дополнително ја потврдува можноста за безболна, минимално инвазивна и ефикасна трансдермална испорака на лекови.

Со вакви иновативни технологии дермалната испорака на лекови добива сè поголемо значење, особено во ситуации кога другите начини на администрација се неефикасни или непожелни.

8.4. Системи за испорака на лекови насочени кон канцер

Канцерот е малигно заболување кое се развива како резултат на неконтролиран и нерегулиран раст на клетки. Тие клетки можат да се размножуваат локално – преку инвазија на околните ткива, или системски – преку создавање метастази во оддалечени органи. Појавата на канцерогените клетки најчесто произлегува од дефекти во механизмите што ја регулираат клеточната пролиферација или терминалната диференцијација.

Фармаколошкиот третман на канцер претставува сложен и сериозен предизвик. Еден од клучните проблеми е следењето на одговорот на туморот од применетата терапија, како и обезбедувањето прецизна и насочена доза на лекот до туморското ткиво. Солидните тумори, вообичаено, се одликуваат со редуцирачка микросредина, предизвикана од хипоксија и зголемено присуство на биоредуктивни ензими. Оваа специфична микросредина се разгледува како целно место за развој на интелигентни системи за испорака на лекови.

Во таа насока развиени се биоредуктивни системи за испорака на лекови кои се активираат во услови на хипоксија и овозможуваат селективно ослободување на лекот во туморското ткиво. Механизмот на дејство на овие системи се заснова на присуството на функционални групи чувствителни на редукција, кои во нормални услови остануваат неактивни, но во редуцирачка микросредина, каква што формира туморот, се трансформираат и иницираат контролирано ослободување на активната супстанција. Електронските својства на овие групи значително влијаат врз потенцијалот за редукција и врз динамиката на ослободување на активната супстанција. Пример за ваков пристап е модификацијата на антинеопластичното средство ацивицин, кое во својата основна форма може да преминува низ крвно-мозочната бариера преку специфични транспортери, што предизвикува невротоксичност. Меѓутоа, со дериватизација ацивицинот се трансформира во форма која не се препознава од транспортерите и не навлегува во мозочното ткиво, со што се зголемува селективноста кон периферните солидни тумори.

Друг пристап за насочена испорака на лекови кон канцер е користење на самите канцерогени клетки како носачи. На пример, клетки од глувчешки меланом што служеле како носачи на доксорубин биле администрирани кај лабораториски стаорци со веќе развиени тумори, при што било забележано значително намалување на бројот на метастази и појава на ремисија.

Липозомите, пак, претставуваат еден од најшироко применуваните системи за испорака на хемотерапевтици. Во овие фосфолипидни везикули може да се инкапсулираат активни супстанции, како паклитаксел, ломустин и имунотоксини, со што се зголемува системската биорасположливост, се подобрува селективноста кон таргетираното ткиво и се намалува токсичноста. Преку интратуморална инјекција на липозомален паклитаксел (паклитаксел-ReGel комплекс) било постигнато локализирано и продолжено задржување на активната супстанција во туморското ткиво, со минимална системска изложеност. Радиоактивното следење покажало дека паклитакселот останува во туморот до шест недели, со полуживот од околу 20 дена (Shikanov et al., 2008).

Аптамерите (синтетички олигонуклеотиди со висока селективност и афинитет) претставуваат понов систем за насочена испорака на лекови. Тие можат специфично да се врзуваат за протеини кои се прекумерно експресирани во туморското ткиво (Hicke et al., 1999). На пример, аптамерот ТТА1, кој има насочено дејство кон протеинот тенасцин-С, покажал значителна акумулација во глиобластомски тумори кај животински модели, како и брз клиренс од циркулацијата, со што се намалува ризикот од несакани ефекти врз здравото ткиво.

Придобивките од ваквите стратегии за насочена испорака на лекови кон канцер се повеќекратни:

- зголемена ефикасност на терапијата;
- намалени несакани ефекти;
- повисока селективност;
- можност за индивидуализиран пристап кон пациентот.

Сепак, остануваат предизвици поврзани со нивната стабилност, репродуктивност во производството и регулаторна усогласеност. Поради тоа развојот и оптимизацијата на системи за насочена испорака на лекови кон канцер и понатаму претставуваат приоритет на современата онколошка фармација.

8.5. Биоразградливи системи за испорака на лекови

Една од клучните цели во современата фармакотерапија е обезбедување испорака на активните супстанции директно до целното место на дејство, во прецизна доза и со контролирано или продолжено ослободување. На овој начин се овозможува одржување на терапевтска концентрација на активната супстанција во таргетираното ткиво или орган, со намален ризик од системски несакани ефекти и намалена потреба од честа администрација. Во оваа насока се развиваат биоразградливи наночестици кои функционираат како напредни носачи на лекови. Тие овозможуваат контролирано ослободување на активната супстанција, а по манифестирањето на терапевтскиот ефект, самите носачи постепено се разградуваат во организмот. Овие системи имаат особено значење во третман на хронични и тешки заболувања, како што се канцерот, ревматоидниот артритис и остеопорозата.

Биоразградливите наночестици се изработуваат од биокompatibilни материјали кои природно се разградуваат во организмот без да предизвикаат токсични ефекти. Тие имаат висок капацитет за инкапсулација на активни супстанции, со што се обезбедува заштита од ензимска деградација и истовремено се подобрува стабилноста на лекот. Особено внимание привлекува нивната примена при орална администрација на пептидни и протеински лекови, како и олигонуклеотиди (ДНК/РНК секвенци), кои, вообичаено, имаат ниска биорасположливост кога се администрираат преку класичните дозирани форми. Бидејќи обезбедуваат заштита од ензимска деградација во гастроинтестиналниот тракт и истовремено ја подобруваат апсорпцијата,

Биоразградливите наночестици претставуваат особено важни носачи за вакцините од новата генерација, кај кои е клучна сигурната и прецизната испорака на биолошки активни молекули. Покрај тоа, биоразградливите системи можат да се модифицираат со специфични површински молекули за таргетирана испорака, што овозможува насочување кон одредени клетки (на пример, канцерогени клетки) и уште повеќе ја зголемува селективноста и ефикасноста на терапијата.

Табела 27. Споредба на различни системи за испорака на лекови (автор)

Тип на систем	Контролирано ослободување	Целна испорака	Биоразградливост	Погодност за пептиди/протеини
Конвенционални таблети	Не	Не	Не	Не
Липозоми	Да	Да	Да	Да
Микроигли	Да	Да (локална)	Да	Да
Биоразградливи наночестици	Да	Да	Да	Да
Директна инјекција	Не	Не	Не	Не

Биоразградливите наночестици претставуваат ветувачки систем за испорака на лекови во современата фармакотерапија, особено кога е потребна прецизна, контролирана и безбедна администрација. Тие имаат значаен потенцијал за подобрување на терапевтските резултати и за поедноставување на начинот на примена кај пациентите.

8.5.1. Својства на наночестиците

Својствата на наночестиците зависат од повеќе фактори, како што се: површинската морфологија, специфичната површина, распределбата на честиците според нивната големина, балк густината, капацитетот и начинот на инкорпорирање на активната супстанција, стапката на нејзино ослободување, хидрофобноста, биоадхезивноста и биоразградливоста. Наночестиците (или микросферите) кои содржат активна супстанција може да се формулираат со примена на кополимери, како, на пример, поли(лактид-ко-гликолид) (PLG) или поли(лактид-ко-етилфосфат). За таа цел се користи соодветна екстрактивна техника и се врши испарување на растворувачот.

За време на подготовката на наночестиците, процесните параметри, како што се: волуменот на фазата, концентрацијата на поливинил алкохол (PVA), составот на полимерот и брзината на мешање, можат да влијаат врз распределбата на честиците според нивната големина и *in vitro* профилите на ослободување на активната супстанција. На пример, доколку станува збор за наночестици со прогестерон, кој се користи за третман или превенција на остеопороза кај жени во постменопауза, со намалување на волуменот на фазата од 22% на 9%, се зголемува стапката на ослободување на прогестерон од наночестиците. Дополнително, со зголемување на концентрацијата на PVA, освен што се зголемува процентот на помали наночестици, истовремено се зголемува и стапката на ослободување на прогестерон од наночестици со иста големина. Составот на полимерот и брзината на мешање, исто така, имаат значајно влијание врз распределбата на честиците и стапката на ослободување на

прогестерон. Сепак, ниту еден од овие параметри не влијае врз ефикасноста на инкорпорирање на прогестерон во наночестиците.

Стапката на ослободување на активната супстанција од наночестиците може да се регулира преку менување на односите на мономерите што се користат при синтезата на кополимерот. Така, поли(лактид-ко-етилфосфат) се добива со топлинска поликондензација на лактид, етил дихлорофосфат и пропилен гликол. Со испарување на растворувачот се добиваат стабилни, неагрегирани наночестици со ефикасност на инкорпорација поголема од 96%. Стапката на ослободување на активната супстанција е највисока кај наночестиците во сооднос 5:1 помеѓу лактид и пропилен гликол, а постепено се намалува кај оние со соодноси 8:1 и 10:1.

Биоразградливите наночестици од сулфобутил-PVA-графт-PLG (SB-PVA) биле споредени со комерцијални полистиренски наночестици, наночестици од PLG и графтирани DEAE-PVA-PLG наночестици, со цел да се процени нивниот афинитет кон монослојни култури од Caco-2 клетки одгледани врз пропустливи мембрански носачи. Притоа било утврдено дека SB-PVA наночестиците со големина од 100 nm покажуваат двапати поголем афинитет кон култивираниите клетки во споредба со другите наночестици со иста големина. Афинитетот на SB-PVA наночестиците дополнително се зголемува во присуство на флуоресцеин-изотиоцијанат конјугиран со говедски серум албумин. Флуоресцентното снимање покажало присуство на наночестици со големина од 100 nm во внатрешноста на клетките, најчесто во базалните делови, како и во мембранските пори под клеточниот монослој. Виталноста на Caco-2 клетките останала непроменета при концентрации на наночестици до 2,5 mg/mL.

Биоразградливи PLG полимери со контролирано ослободување, во кои бил инкорпориран паратиroidен хормон, биле формулирани како лиофилизиран прашок со големина на наночестиците во опсег од 27 до 47 μm . Процесот на лиофилизација не ја изменил површинската морфологија, големината на наночестиците, ниту, пак, содржината или стапката на ослободување на паратиroidниот хормон од нив. Леофилизираните наночестици многу брзо и рамномерно се ресуспендирале во раствор. *In vitro* студиите за ослободување покажале дека, освен нагло почетно ослободување од 4% до 18%, паратиroidниот хормон од наночестиците се ослободувал многу бавно во текот на првите 14 дена. Дури по петнаесеттиот ден, ослободувањето на паратиroidниот хормон нагло се забрзало.

8.5.2. *In vivo* примена на биоразградливите системи за испорака на лекови

За да се проучи ефектот на големината на честиците на активната супстанција и/или носачите врз постигнувањето оптимална испорака до солидни тумори, на лабораториски глувци со индуцирани цврсти неоплазми системски им биле администрирани полистиренски наночестици со паклитаксел, флуоресцентно обележани и стабилизирани со сурфактант. Испораката на наночестиците до солидните тумори зависи од нивната големина. Притоа, туморите апсорбирале четири до петпати поголем број наночестици со средна големина од 100 nm во споредба со оние со средна големина од 200 nm. Како што било очекувано, ефикасноста на паклитаксел да предизвика цитотоксичен одговор кај туморските клетки зависела од количината на наночестици што ги апсорбирале туморите.

Сферични наночестици од PLG со релативно мала површинска порозност и големина околу 17 μm биле формулирани да содржат антагонист на LHRH (лутеинизирачки хормон-ослободувачки хормон) – Orntide, со цел супресија на тестостеронот, на пример кај пациенти со карцином на простата. *In vivo* студиите за ослободување покажале дека пептидот се ослободувал континуирано најмалку 30 дена. Во животински модел зголемено ниво на пептидот во крвта било регистрирано во период од 28 – 30 дена, додека нивото на тестостерон било супресирано најмалку 30 – 35 дена. Почетен пораст на нивото на тестостерон во крвта не бил забележан, а супресијата започнала во рок од 6 часа.

Моноартикуларен артритис бил предизвикан во левиот зглоб на коленото кај зајаци со инјектирање на овалбумин како антиген, во комбинација со Фројндов

комплетен адјуванс за засилување на имунолошкиот одговор. Во зглобовите биле инјектирани наночестици на напроксен натриум, кои биле мазни, сферични и со големина од приближно 5 – 9 μm . Со текот на времето, разликата меѓу артритичните и нормалните зглобови се намалувала. Наночестиците на напроксен натриум покажале поголема ефикасност во споредба со конвенционалниот лек.

Рестенозата претставува повторно стеснување на крвните садови по нивно проширување со ангиопластика и е една од главните компликации по коронарна интервенција. Освен повторно изведување на хируршка интервенција, како алтернатива се разгледува директна испорака на лекови наместо рестеноза со катетер. За таа цел биле формулирани наночестици и микрочестици од PLG полимер. Во нив биле инкорпорирани две средства – дексаметазон и U86983 (2-аминохормон со антипролиферативно дејство) – кои кај лабораториски стаорци со рестеноза овозможиле обновување на протокот низ каротидната артерија. Овие наночестици и микрочестици дополнително биле обложени со додецилметиламониум бромид за да се обезбеди оптимално ослободување на активните супстанции на сидовите на крвните садови. Во студии со коронарна ангиопластика кај свињи, рестенозата била успешно спречена со доставување наночестици што содржеле U86983 до местото на интервенција. Овој пристап има потенцијал за примена и во третманот на луѓе.

8.6. Системи за испорака на протеински лекови

Протеинските лекови – како хормоните, протеините и малите пептиди – не се погодни за орална примена доколку формулацијата на биде соодветно модифицирана (Mehrotra et al., 2023). За да се прикажат предизвиците и напорите вложени во развојот на вакви системи, инсулинот често се користи како пример во експерименталните истражувања.

Инсулин е главниот лек кој се користи за спречување кетоза и за одржување на животот кај пациенти со дијабетес мелитус тип I (инсулин-зависен дијабетес) (Weiss et al., 2014). Испораката на протеини како инсулинот претставува голем предизвик затоа што ваквите молекули имаат висока молекулска маса и се исклучително чувствителни, па дури и мали промени во нивната тридимензионална структура резултираат со губење на нивната биолошка активност.

Во моментот најчесто начини на администрација на инсулин се интрамускулните, поткожните и интравенските инјекции (Weiss et al., 2014). Сепак, овие начини не се идеални, пред сè поради:

- потребата пациентот или неговиот негувател да бидат обучени за правилно аплицирање на инјекцијата;
- стравот од игла кај пациентите;
- болката, како и можната појава на фиброзни промени на местото на апликација.

Ваквите ограничувања често доведуваат до намалено придржување на пациентите кон терапијата. Поради тоа, со цел да се подобри биорасположливоста на овој важен протеински лек, развиени се алтернативни пристапи за негова испорака преку орална, белодробна (назална), ректална, дермална и очна патека. Секој од овие пристапи има свои предности и ограничувања, но заедничката цел е да се обезбеди ефективна, безболна и практична алтернатива на конвенционалните начини на администрација на инсулин.

8.6.1. Орална патека за испорака на инсулин

Еден од најголемите предизвици при оралната администрација на инсулин е потребата од лекот да ја надмине киселата средина во желудникот и дејството на ензимите пептидази во желудникот и тенкото црево, бидејќи истите може да предизвикаат негова инактивација пред да се апсорбира во системската циркулација. За надминување на овие бариери развиени се различни технологии со цел да се подобри оралната биорасположливост на инсулинот, како што се: инкапсулација во дозирани форми и наночестици со брзо, контролирано и продолжено ослободување,

мицеларни формулации, комбинација со жолчни киселини, конјугација со амфифилни полимери, алкилни синџири и деривати на шеќери, конјугација со трансферин или, пак, коадминистрација со средства за испорака.

— ***Инкапсулација во дозирани форми и наночестици со брзо, контролирано или продолжено ослободување***

Еден од пристапите е инкапсулација на инсулинот во дозирани форми со брзо или контролирано ослободување. Пример за тоа е таблета со повеќеслојна обвивка, во која јадрото содржи инсулин, а надворешниот слој е изработен од хидрофилни полимери (полиетилен оксид и полиетилен гликол). При движење низ гастроинтестиналниот тракт, надворешниот слој се желатинизира, што овозможува навлегување на вода во внатрешноста на таблетата и постепено ослободување на инсулинот. На овој начин инсулинот се ослободува во тенкото црево. Кај кучиња ваквата формулација довела до намалување на нивото на глукоза во плазмата приближно два часа по оралната администрација.

Покрај класичните дозирани форми, развиени се и наноструктурирани системи за испорака. Таков пример е системот во кој инсулинот се инкапсулира во агарозен хидрогел и потоа се обложува со PLG, формирајќи наночестици со дијаметар од околу 150 μm и капацитет на полнење од 90%. Овие наночестици покажале карактеристики на продолжено ослободување, а по орална администрација кај лабораториски стаорци со индуциран дијабетес, предизвикале значително и дозно-зависно намалување на нивото на глукоза во крвта во рок од 4 часа, со времетраење на ефектот до 8 часа.

— ***Мицеларни формулации***

Друг ефективен пристап е употребата на орална мицеларна формулација што содржи 50 единици инсулин. Кај луѓе оваа формулација предизвикала намалување на концентрацијата на C-пептид во плазмата (индиректен маркер за активноста на ендогениот инсулин), слично на ефектот што се постигнува со поткожна администрација на 10 единици инсулин. Дејството на оралната формулација започнало побрзо во споредба со поткожната. Дополнително, студии кај пациенти со дијабетес покажале дека формулации со 30 и 50 единици инсулин имаат биорасположливост од 55% до 68% во однос на поткожната администрација, споредено преку добиените вредности за површина под крива (AUC). Оваа ниска апсорпција укажува на ограничување на оралната патека, иако побрзиот почеток на дејство претставува одредена предност.

— ***Комбинација со жолчни киселини***

Инсулинот може да се комбинира со жолчни соли (како деоксихолат) и липофилни молекули (како натриум палмитат). Овие дисперзии при орална администрација во дози од 10 до 40 единици/kg кај животни резултирале со значително намалување на нивото на глукоза во крвта за 30 минути по администрацијата, со времетраење на ефектот до 4 часа.

— ***Конјугација со амфифилни полимери, алкилни синџири или деривати на шеќери***

Инсулинот може да се конјугира со амфифилни полимери што содржат полиетилен гликол (PEG), алкилни синџири или деривати на шеќери. Ваквите конјугати покажале висока отпорност кон ензимска деградација и значителна биолошка активност. Кај лабораториски стаорци, некои од нив, администрирани поткожно, имале сличен ефект како немодифицираниот (неконјугиран) инсулин, додека при орална администрација предизвикале намалување на концентрацијата на глукоза во крвта.

— ***Конјугација со трансферин***

Експериментален метод за подобрување на оралната апсорпција е конјугацијата на инсулинот со трансферин. Овој комплекс предизвикал намалување на нивото на

глюкоза во крвта кај лабораториски стаорци со индуциран дијабетес за 28%. Кога животните биле претходно третирани со брефелдин А, односно средство што ја засилува трансцитозата преку трансферинските рецептори во цревниот епител, ефектот се зголемил на 40%, бидејќи поголемо количество инсулин преминало во системската циркулација за да ја намали гликемијата.

– **Коадминистрација со средства за испорака**

Друг пристап е коадминистрацијата на инсулин со дериватизирани не- α -аминокиселини како средства за испорака, кои служат за надминување на физиолошките бариери при орална администрација на инсулин. Кај лабораториски стаорци со индуциран дијабетес комбинацијата на инсулин со вакви средства предизвикала намалување на нивото на глюкоза во крвта за околу 50%, споредено со околу 60% намалување добиено со поткожно администриран инсулин.

8.6.2. Белодробна (назална) патека за испорака на инсулин

Испораката на лекови преку белодробната (назална) патека претставува одржлива алтернатива на традиционалната орална администрација, особено за лекови со слаба биорасположливост при перорален внес, како што е инсулинот. Оваа патека овозможува директен влез на активната супстанција во системската циркулација преку богатата капиларна мрежа на алвеолите, при што се избегнува метаболизмот на прв премин во црниот дроб и ензимската деградација во гастроинтестиналниот тракт. За таа цел биле подготвени наноформулации во кои инсулинот бил комплексиран со хепарин со ниска молекулска маса, добиени со мешање на водени раствори на инсулин и хепарин, во сооднос 20:80 (w/w). Добиената формулација (0,1 mL) била администрирана директно во белите дробови на анестезирани машки зајаци од расата New Zealand White со помош на катетер. Комплексот инсулин–хепарин, во доза од 1 единица инсулин/kg, предизвикал продолжено намалување на нивото на глюкоза во крвта во период од пет часа по белодробната администрација. Конкретно, гликемијата била намалена за 88% по два часа и за 70% на крајот од петтиот час. Овие резултати укажуваат на стабилен и долготраен хипогликемичен ефект.

Во споредба со неутралниот протамински инсулин Хегедорн, хипогликемичниот ефект на комплексот инсулин–хепарин бил приближно трипати посилен. Се смета дека хепаринот ја подобрува апсорпцијата на инсулинот во белите дробови, најверојатно преку зголемување на неговата растворливост, продолжување на времето на задржување на белодробната површина или олеснување на преминот низ алвеоларната бариера.

Овој пристап ја нагласува потенцијалната примена на белодробната патека за испорака на биолошки лекови, каков што е инсулинот, и отвора можности за развој на неинвазивни и ефективни терапии за хронични заболувања, како што е дијабетесот.

8.6.3. Ректална патека за испорака на инсулин

Инсулинот може да се администрира и преку ректален пат. За таа цел била развиена течна формулација, која, по воведувањето во ректумот, се трансформира во гел-супозиторија. Мукоадхезивната течна супозиторија составена од инсулин, полксамер P407, полксамер P188, поликарбофил и натриум салицилат (во сооднос 100 единици/g: 15%:20%:0,2%:10%) предизвикала намалување на нивото на глюкоза во плазмата кај лабораториски стаорци со индуциран дијабетес во рок од половина час. За споредба, цврста супозиторија што содржи инсулин, исто така, предизвикала намалување на нивото на глюкоза во плазмата кај лабораториски стаорци, но со значително подоцнежен почеток на дејството. Оптималната температура на желатинизација на течната супозиторија изнесувала 32 °C, додека конзистентноста на гелот, измерена како време на пенетрација, била 22,3 секунди. Биоадхезивната сила на формулацијата изнесувала 3800 dyn/cm². По апликацијата не било забележано морфолошко оштетување на ректалните ткива.

8.6.4. Дермална патека за испорака на инсулин

При испитувањето на дермалната патека за испорака на инсулин бил користен компримиран хелиум во уредот *PowderJect* за администрирање инсулин во форма на сув прашок во кожата, од каде што понатаму се апсорбирал во системската циркулација. Притоа, биле подготвени 11 прашочни формулации со хуман инсулин, добиени преку лиофилизација, компресија, мелење и просејување (38–53 μm), при што натриум фосфат бил користен како полнител. 1 mg од формулацијата бил администриран со помош на уредот *PowderJect* на избричана кожа кај анестезирани лабораториски стаорци, во дози еквивалентни на 0 (контролна група без инсулин), 1, 3 и 10 единици/kg инсулин. Фармакокинетичката анализа покажала дека AUC на инсулинот била пропорционална на применетите дози. Во првите 60 минути по администрацијата било забележано значително намалување на нивото на глукоза во крвта, а кај дозите од 3 и 10 единици/kg, хипогликемичниот ефект се одржувал повеќе од 240 минути (Hickey et al., 1998).

Еден од пристапите за трансдермална испорака на протеини е употребата на липиден бифазен систем. Во овој случај инсулинската формулација (10 – 50 mg/g) била администрирана преку трансдермален фластер поставен на абдоменот на анестезирани лабораториски стаорци кај кој дијабетесот бил индуциран со единечна инјекција на стрептозотцин (55 mg/kg). На секои 2–4 часа од опашната вена на стаорците била земена крв во тек на 48 часа. Одговорот на трансдермално администрираниот инсулин зависел од pH и од неговата концентрација во формулацијата. Кај третираните животни нивото на глукоза во крвта било намалено за 55%, со просечно времетраење на одговорот од 15 часа. Нивото на серумски инсулин изнесувало 162 pg/mL.

8.6.5. Очна патека за испорака на инсулин

Лековите можат да се администрираат преку окото во форма на капки за очи или со примена на очни уреди. Во таа насока инсулинот, во форма на натриумов или цинков дериват, бил инкорпориран во уред базиран на Gelfoam сунѓер. Резултатите од *in vitro* тестовите за растворливост покажале дека ослободувањето на инсулинот од уредот е директно пропорционално со брзината на проток на медиумот за растворање. Дополнително, *in vivo* испитувањата ја потврдиле хипотезата дека постои директна корелација помеѓу продолжениот фармаколошки ефект на инсулинот и неговото контролирано ослободување од очниот уред.

Уредот, со или без додаток на средство за засилување на апсорпцијата, бил аплициран кај зајаци и предизвикал стабилен хипогликемичен ефект, со намалување на нивото на глукоза во крвта до 60% во текот на 8 часа. По отстранувањето на уредот од окото, нивото на глукоза постепено се враќало на почетните вредности, што го потврдува значењето на континуираното ослободување за одржување на терапевтскиот ефект.

Се смета дека бавната и континуирана секреција на солзи, како и нивната елиминација преку долниот конјуктивален свод, придонесуваат за продолженото ослободување на инсулинот и за одржување на неговото трајно фармаколошко дејство. За споредба, при администрација на иста доза инсулин во форма на капки за очи, во кои покрај инсулинот било додадено и средство за засилување на апсорпцијата, бил забележан само краткотраен ефект. Имено, нивото на глукоза во крвта нагло се намалило во рок од 1,5 часа, за разлика од продолженото дејство постигнато со уредот.

8.7. Уреди

8.7.1. Инјектори без игла

Многу лекови, вклучувајќи вакцини против грип и хепатитис Б, инсулин, хормон за раст, женски хормони и одредени антибиотици, не се погодни за орална администрација. Како алтернатива, тие се администрираат во форма на инјекции. Се проценува дека секоја година се аплицираат приближно 550 милиони дози вакцини, хормони, адреналин, еритропоетин, лекови за мигрена и други терапевтски протеини.

Овие лекови се чуваат во ампули и се аплицираат со помош на шприцеви или, пак, се користат претходно наполнети шприцеви за нивната апликација. Ваквата испорака често се перципира како болна и непријатна, што предизвикува страв кај пациентите. Во САД секоја година околу еден милион лица се соочуваат со повреди или инфекции предизвикани од хиподермични игли, кои често бараат медицинска интервенција. За надминување на овие недостатоци развиени се инјектори без игла, со цел намалување на болката и стравот, како и подобрување на придржувањето кон терапијата кај пациентите. Постојат два вида инјектори без игла: за течни и за прашочни формулации. Тие се користат за испорака на различни лекови, како што се: вакцини, апростадил, лидокаин, како и ДНК-обложени честичи.

Концептот се базира на поминување на течност или прашок преку тесен отвор (вообичаено, со дијаметар од 0,5–0,7 mm), кој се поставува директно над кожата. Притоа, брзината на проток и дијаметарот на отворот се клучни за обезбедување соодветна пенетрација. Кога станува збор за брзината на проток, важно е да се напомене дека лекот треба да се потиснува од уредот со што е можно повисока брзина за да се постигне доволна пенетрациска моќ. Во однос на дијаметарот, важно е да се истакне дека премал дијаметар води до недоволна пенетрација, додека преголем дијаметар предизвикува болка. За потиснување на лекот и создавање млаз под висок притисок се користи клип или пумпа со клип, додека потребната енергија се обезбедува со пружини, батерии, компримиран воздух или гасни патрони со јаглерод диоксид или хелиум.

Intraject е претходно наполнет уред за еднократна употреба со големина на пенкало, наменет за поткожна администрација на лекови како инсулин, хормон за раст или лекови за терапија на мигрена. Уредот содржи стаклена ампула со лек, која се активира со азотен гас. При употреба, стаклениот врв се крши и лекот се аплицира под кожата преку млаз под висок притисок. Целиот процес трае помалку од 50 ms и предизвикува минимално чувство на болка, слично на пецкање. Волуменот што може да се администрира се движи од 0,1 до 1,0 mL. Според студиите, фармакокинетичкиот профил на лековите администрирани со Intraject е споредлив со оној кај стандардна поткожна инјекција, но со побрз почеток на дејство и повисока максимална плазматска концентрација, што се должи на подобрата дисперзија на лекот.

Дневната поткожна инјекција со хормонот за раст претставува стандардна терапија кај деца и адолесценти со дефицит на овој хормон. Во една рандомизирана студија 18 пациенти на возраст од 11 до 20 години примале рекомбинантен хуман хормон за раст (rhGH) со или без употреба на игла, во период од 4 седмици. Анализирани биле нивоата на хормонот за раст (GH), инсулин-сличниот фактор на раст I (IGF-I), инсулин-сличниот фактор на раст врзувачки протеин 3 (IGFBP-3), глукоза, инсулин, гликозилиран хемоглобин (HbA1c) и слободни масни киселини (FFA). Резултатите покажале дека апсорпцијата (површина под кривата, максимална плазматска концентрација и време на постигнување на максимална концентрација), фармакодинамиката и биорасположливоста на rhGH биле идентични кај двете групи пациенти (со игла и без игла). Серумските нивоа на IGF-I и IGFBP-3, како и ефектите врз глукозата и FFA, биле споредливи. Заклучокот бил дека уредот без игла може да претставува ефикасна и поудобна алтернатива за долготрајна администрација на хормонот за раст кај деца и адолесценти.

Кај инјекторите за прашок без игла лекот прво се формулира во форма на фин прашок со соодветна големина и форма на честичи. За таа цел може да се применат различни техники, како што се: мелење под притисок, просејување или сушење со замрзнување и прскање. На овој начин се добиваат сферични честичи со контролирани димензии, погодни за инјектирање.

Во рачниот уред честичите се забрзуваат со краткотраен млаз на хелиумски гас, кој се движи со многу висока брзина. Динамиката на гасот и физичките својства на честичите го одредуваат начинот на нивна испорака во кожата. Длабочината на пенетрација е пропорционална на енергијата на импулсот, а составот на прашокот дополнително може да влијае врз профилот на ослободување на лекот. Вообичаено,

честиците имаат дијаметар од 20–70 μm , површината на кожата опфатена со апликацијата изнесува 3–16 mm во дијаметар, а количината на испорачаниот прашок е 0,5–3,0 mg .

Инјекторот за прашок без игла (PowderJect) бил користен за интрадермално аплицирање на ДНК вакцини кај глувци (Jenkins, 1999). Нанограмски количини на ДНК, која го носи генот што кодира за синтеза на нуклеопротеинот на вирусот на инфлуенца А, биле обложени на златни честици. Овие честици предизвикале силен цитотоксичен имунолошки одговор на CD8^+ Т-лимфоцитите, специфични за нуклеопротеинот, што укажува на висока ефикасност на имунизацијата со ДНК вакцината. Стратегија за имунизација, што се состоела од примарна апликација со ДНК вакцина, проследена со бустер-доза со рекомбинантен модифициран вирус Vaccinia Ankara (MVA), обезбедила целосна заштита од инфекција со спорозоити на *Plasmodium berghei* кај глувци (Jenkins, 1999). Ефикасноста била потврдена преку појава на високи нивоа на CD8^+ Т-лимфоцити. Употребата на PowderJect овозможила употреба на десетпати помала количина на ДНК за да се постигнат еднакво високи имунолошки одговори на CD8^+ Т-лимфоцитите и исти нивоа на заштита во споредба со класична интрамускулна инјекција.

PowderJect бил употребен за администрирање лидокаин хидрохлорид во форма на сув прашок на оралните мукозни површини кај 14 возрасни здрави доброволци, како дел од отворена, нерандомизирана, плацебо-контролирана студија. Апликацијата не предизвикала видливо оштетување на мукозата. Интензитетот на болката бил оценет една минута по апликацијата со сондирање со тапа игла. Средната вредност на местата третирани со PowderJect изнесувала 10, на местата третирани со плацебо – 30, а на контролните места без третман – 58. Овие резултати укажуваат дека апликацијата со уредот не предизвикува оштетување на ткивото и овозможува ефикасна испорака на лекот на местото на дејство.

8.7.2. Импланти

Имплантите се уреди дизајнирани за долготрајна испорака на лекови, како што е инсулинот за третман на дијабетес. Формулациите на протеини може да се администрираат со помош на програмабилни пумпи (пумпи што можат да се програмираат да испорачуваат лек во одредени интервали или по потреба) или инфузиони пумпи со константна брзина (класични пумпи што испорачуваат лек со фиксна брзина, без можност за прилагодување). Хемиската стабилност на лекот за таков продолжен период мора да се потврди со HPLC и спектроскопски методи, додека физичката стабилност може да се процени со различни техники, вклучувајќи: тестирање на стабилност при забрзани вибрации на шишенца, кружен дихроизам, флуоресцентна спектроскопија и динамичко расејување на ласерска светлина.

Најважните фактори што влијаат врз перформансите на инсулинските формулации во пумпите се: изборот на пуфер, неговата јачина и рН вредноста. Концентрацијата на цинк игра клучна улога, додека хелатните агенси имаат мал или занемарлив ефект врз физичката стабилност на формулациите. Важно е да се напомене дека варијабилноста меѓу различни серии на активна супстанција може значително да ја наруши физичката стабилност на лекот. Оваа стабилност е директно поврзана со *in vivo* перформансите и може да се процени преку тестирање на физичката стабилност на формулацијата под забрзани услови на стрес.

Пример: Имплант Hydron

Развиен е имплант од биокомпатибилен синтетички полимер кој формира хидрогел и содржи резервоар исполнет со неразградливи хидрогели. Уредот е наменет за долготраен третман (една година или повеќе). Содржината на вода во хидрогелите може прецизно да се прилагоди, со што се контролира нивната пропустливост и се постигнуваат однапред дефинирани стапки на ослободување на лекот. Имплантот е изработен од вкрстено поврзан кополимер на хидроксипропил метакрилат и 2-хидроксиетил метакрилат и се применува во третман на карцином на простата (Fowler

et al., 2000). Терапијата со агонисти на гонадотропин-ослободувачки хормон (GnRH) предизвикува андрогенска депривација, односно намалување на нивото на машки полови хормони, што резултира со регресија на туморските лезии и симптоматско подобрување кај 80–90% од пациентите. Во клиничка студија со 42 пациенти со рак на простата (B1–D2 стадиум), едногодишна терапија со имплантот што содржел GnRH агонисти довела до супресија на лутеинизирачкиот хормон и до намалување на тестостеронот до нивоа еквивалентни на оние постигнати со хируршка кастрација (т.н. кастрациони нивоа) (Fowler et al., 2000). Дополнително, кај пациентите е постигната нормализација на простата-специфичниот антиген, а по 20 месеци терапија кај 13 од нив бил забележан целосен терапевтски одговор.

Пример: Имплант DUROS

Поткожниот имплант DUROS претставува осмотска пумпа што содржи протеини во форма на сув прашок, добиен со лиофилизација или сушење со прскање. Прашокот е суспендиран во неводен медиум. Имплантот овозможува долгорочно ослободување на протеини, при што со промена на полупропустливата мембрана овој период може да се движи од еден до дванаесет месеци. Во одредени студии човечки хормон за раст (hGH), подготвен со сушење со прскање, бил суспендиран во различни неводени медиуми и била испитувана неговата стабилност и профилот на ослободување (Stenport et al., 2001). По три месеци на 37 °C, според хроматографски анализи, било утврдено дека формулациите задржале над 90% од почетното количество на hGH. Дополнително, *in vitro* испитувањата покажале континуирана испорака на 150 µg/ден во првичниот период од три месеци. Во *in vivo* студии со стаорци кај кои претходно била хируршки отстранета хипофизата биле забележани стабилен раст и зголемени нивоа на IGF-I, што укажува дека ослободениот протеин ја задржал биолошката активност (Stenport et al., 2001).

8.7.3. Инхалатори

Инхалаторниот пат на администрација овозможува директна испорака на активната супстанција до ткивата на белите дробови, при што за постигнување соодветен терапевтски ефект, потребна е релативно мала количина лек. Овој начин на примена е поврзан со пониска веројатност за системски несакани ефекти во споредба со оралната или интравенската администрација. Дополнително, инхалираните лекови, вообичаено, имаат побрз почеток на дејство во однос на оние што се применуваат орално.

Количината на честици што навлегуваат во белите дробови и нивната распределба зависат од техниката на инхалација, физичко-хемиските својства на аеросолот и физиолошките карактеристики на пациентот (Zierenberg, 1999).

Главни видови инхалатори се:

- Инхалатори со одмерена доза (Metered-Dose Inhalers – MDI);
- Инхалатори со сув прашок (Dry-Powder Inhalers – DPI);
- Небулизатори (млазни и ултразвучни).

И MDI и DPI имаат релативно ниска ефикасност бидејќи значителен дел од лекот се таложи во усната шуплина и потоа се голта. Кај MDI ефикасноста може да се зголеми со употреба на посебни комори (spacers) што овозможуваат лекот да се вдише постепено или со подобра координација меѓу активирањето на уредот и вдишувањето. Кај DPI, пак, ефикасноста може да се подобри со примена на специјални ексципиенси и со дизајн кој овозможува бавно и континуирано ослободување на аеросолот.

Табела 28. Карактеристики на различни видови инхалатори (автор)

Карактеристика	MDI	DPI	Млазни небулизатори
Механизам на ослободување	Притисок со пропелент	Вдишување на пациентот	Механичка пружина
Брзина на аеросол (m/s)	≈ 30	Варијабилна	≈ 10
Просечна испорака до белите дробови (%)	< 20	20–30	31–45
Орофарингеално таложeње (%)	≈ 72	≈ 50	≈ 37
Време на ослободување на доза (s)	< 0,5	Варијабилно	≈ 1,2
Ефикасност со намалена доза	Ниска	Средна	Висока
Потреба од координација при администрација	Да	Да	Не
Ризик од несакани ефекти	Висок	Среден	Низок

Пример: Инхалатор Respimat

Respimat е инхалатор за повеќекратна употреба што користи механичка енергија од намотана пружина за да ослободи воедначен, бавнодвижечки аеросол во форма на фина магла (Pavia & Moonen, 1999; Kunkel et al., 2000). Аеросолот се создава преку конвергенција, односно судир на два млаза течност, при што се формира висок процент фини честички (66% за воден раствор и 81% за етанолен раствор) и се обезбедува пониска брзина на ослободување на дозата (10 m/s). Времето на ослободување е приближно 1,2 секунди, што е значително подолго отколку кај класичните MDI.

Студиите покажале дека Respimat испорачува поголем процент на лек во белите дробови (31–45%) во споредба со инхалаторите со одмерена доза кои користат хлорофлуоројагледородороди како пропелент (CFC MDI), кај кои процентот е под 20%. Орофарингеалното таложeње е значително пониско (37% наспроти 72%), што укажува на намален ризик од локални несакани ефекти. Дополнително, Respimat овозможува рамномерна распределба на лекот низ сите зони на белите дробови, за разлика од MDI.

Во контролирана студија со 43 пациенти со стабилна астма, постигната е иста бронходилатација со половина од дозата администрирана преку Respimat во споредба со MDI. Кај 36 пациенти со хронична опструктивна белодробна болест (ХОББ) ефектот на ипратропиум бил значително поголем со Respimat и бил постигнат со половина доза (160 µg наспроти 320 µg). Безбедносните профили на двете форми биле слични (Pavia & Moonen, 1999).

Инхалаторите претставуваат клучна алатка во третманот на респираторни заболувања, како што се астма и ХОББ (Zierenberg, 1999). Развојот на инхалатори како Respimat овозможува подобро таложeње на лекот во белите дробови, намалување на несаканите ефекти и постигнување терапевтско дејство со пониски дози. Ова е од суштинско значење за подобрување на придржувањето кон терапијата и за зголемување на нејзината ефикасност.

Напредокот на современите технологии за испорака на лекови отвора нови можности за третман на различни заболувања. Дел од овие иновативни системи веќе се применуваат, додека други сè уште се во експериментална фаза со охрабрувачки резултати. Потребни се понатамошни истражувања за да се продлабочи разбирањето и да се усовршат стратегиите за безбедна, ефикасна и целно насочена испорака на лекови кај луѓето.

9. КУЛТУРА НА КВАЛИТЕТ И ДОБРИ ПРОИЗВОДСТВЕНИ ПРАКТИКИ ВО ФАРМАЦЕВТСКАТА ИНДУСТРИЈА

Фармацевтската индустрија има суштинска улога во заштита на јавното здравје, бидејќи е директно одговорна за развој, производство и дистрибуција на лекови. Во овој контекст, квалитетот на производите и безбедноста на пациентите претставуваат основни приоритети. За нивно обезбедување неопходно е во организациите да се негува силна и стабилна култура на квалитет.

Современата фармацевтска индустрија се соочува со сериозни предизвици во однос на гарантирањето на безбедноста, квалитетот и ефикасноста на лековите. Почитувањето на принципите на добрите производствени практики (Good Manufacturing Practices – GMP) и воспоставувањето систем за управување со квалитет (Quality Management System – QMS) не се само технички обврски, туку и темели врз кои се гради довербата на здравствените работници, регулаторните тела и пациентите (ICH Q10, 2007).

Во ера на засилена глобализација, брз технолошки развој и мултинационална трговија со лекови, одржувањето висок квалитет и безбедност е императив. Земјите членки на ЕУ, како и други водечки здравствени пазари, ги интегрираат овие стандарди во своите национални закони и практики, со што се обезбедува квалитетна заштита на јавното здравје. Во Македонија примената на овие стандарди е во постојан подем преку усогласување со европските директиви и регулативи.

9.1. Концепт на култура на квалитет

Културата на квалитет претставува збир на вредности, уверувања и однесувања што ја одразуваат посветеноста на една организација кон обезбедување квалитет во сите аспекти од работењето. Историјата на управувањето со квалитет покажува дека првичниот акцент бил ставен на контролата на квалитетот (Quality Control – QC), при што главен фокус бил на тестирањето на готовиот производ. Со текот на времето индустријата направила значаен исчекор кон обезбедувањето на квалитетот (Quality Assurance – QA), при што акцентот се става на превенција на грешки, наместо нивно откривање.

Современите трендови одат уште подалеку – кон создавање организациска култура во која квалитетот е вграден во секојдневното одлучување и дејствување. Таа култура не се однесува само на техничките аспекти, туку и на однесувањето и етичката посветеност на вработените на сите нивоа.

Конечно, културата на квалитет може да се дефинира како колективен начин на размислување и однесување на вработените во една организација, каде што секој поединец е посветен на квалитетот, безбедноста и регулаторната усогласеност. Овој концепт ги надминува стандардните процедури бидејќи се однесува на вредности, одговорност, интегритет и постојана свест за квалитет во секоја активност.

Усогласувањето со принципите на GMP и воспоставувањето ефикасен QMS не претставуваат само регулаторна обврска, туку се и предуслов за долгорочна сигурност, рентабилност и кредибилитет на секоја фармацевтска организација.

9.2. Добри производствени практики

Во тесна поврзаност со културата на квалитет е концептот на добри производствени практики (GMP). GMP претставува систем на насоки и регулативи што гарантира дека производите се произведуваат и контролираат согласно однапред утврдени стандарди за квалитет (WHO, 2021b). Овие практики ги опфаќаат сите аспекти на производниот процес: од сировини, објекти и опрема, па сè до документација и квалификација на персоналот.

Главната цел на GMP е да се спречат потенцијалните ризици, како што се вкрстена контаминација, погрешно етикетање, фалсификување, како и грешки во документацијата коишто може да имаат сериозни последици по безбедноста на пациентите (WHO, 2021b).

За подобро разбирање и примена на GMP, во праксата често се користи моделот „5P“, кој ги опфаќа следниве компоненти:

- **People (Луѓе)**: обучени и квалификувани вработени кои ги следат воспоставените процедури;
- **Premises (Простории)**: чисти, соодветно дизајнирани и редовно одржувани производни објекти;
- **Processes (Процеси)**: добро дефинирани, документирани и валидирани производни процеси;
- **Products (Производи)**: производи кои се следливи, тестирани и усогласени со спецификациите;
- **Procedures (Постапки)**: стандардни оперативни постапки (SOPs) кои обезбедуваат доследност и повторливост.

Табела 29. Споредба на основните елементи на GMP според моделот „5P“ (автор)

Елемент	Опис	Цел во GMP	Типични активности / примери
People (Луѓе)	Обучени и квалификувани вработени за GMP активности	Осигурување дека персоналот е компетентен, одговорен и свесен за квалитетот	Обука за SOP, развој на вештини, контрола на пристап до чисти зони
Premises (Простории)	Производни простории и објекти по GMP стандарди	Спречување на контаминација и обезбедување чиста, контролирана средина	Чисти простории, контрола на температура и влажност, дефинирани заштитни зони
Processes (Процеси)	Детално дефинирани, документирани и контролирани процеси на производство	Обезбедување доследност, повторливост и квалитет на производите	Валидација на процеси, следење на критични параметри, користење на SOP
Products (Производи)	Крајни производи кои мора да ги исполнуваат квалитативните и безбедносните критериуми	Испорака на безбеден, ефикасен и следлив производ до пациентот	Контрола на квалитет, лабораториски тестирања, складирање според пропишаните услови
Procedures (Постапки)	Документирани упатства за сите GMP активности (SOPs)	Обезбедување стандардизација, доследност и следливост на активностите	Стандардни оперативни постапки, запишување на резултати, ревизија и ажурирање на документи

GMP обезбедува јасно дефинирани барања за секој аспект на производството на лекови (European Commission, 2022b). Примената на GMP се реализира преку следниве клучни елементи:

- стандардни оперативни постапки;
- валидација на производни процеси;
- континуиран мониторинг и соодветна документација;
- квалификација на опремата и персоналот;
- евидентирање и проследување на девијации и рекламации.

Табела 30. Критични елементи на GMP (автор)

Критична област	Опис
Чистота на производната зона	Обезбедување класификација на просториите (ISO 5–8) и контрола на биооптоварувањето
Обука на персонал	Водење евиденција за иницијална континуирана обука на секој вработен
Квалификација на опрема	Квалификација на опрема: <ul style="list-style-type: none"> – квалификација на дизајн (Design qualification – DQ); – инсталациска квалификација (Installation qualification – IQ); – оперативна квалификација (Operational qualification – OQ); – квалификација на перформанси (Performance Qualification – PQ)
Контрола на документација	Систематска ревизија, архивирање и обезбедување на одобрени верзии на SOPs

9.3. Систем за управување со квалитет

Системот за управување со квалитет (QMS) претставува структуриран збир на процеси, политики и одговорности што ѝ овозможуваат на организацијата да работи доследно, ефикасно и во согласност со барањата за квалитет. QMS има централна улога во осигурувањето дека сите активности, од производство до испорака на услуги, се изведуваат на начин што го зголемува задоволството на потрошувачите и ги исполнува или надминува нивните очекувања.

Секоја организација го прилагодува својот QMS според сопствените потреби, индустриските стандарди и регулаторните барања. Системот опфаќа формализирани политики, процедури, процеси и документирана евиденција кои овозможуваат стандардизација, следење и континуирано унапредување на квалитетот.

Клучни придобивки од QMS:

- **Зголемена стандардизација и конзистентност:** процесите и резултатите стануваат предвидливи и повторливи, што обезбедува стабилно ниво на квалитет;
- **Намалување на грешки и зголемена ефикасност:** преку идентификација и елиминирање на причините за дефекти организацијата постигнува подобра контрола врз производството и услугите;
- **Подобрено задоволство на клиентите:** конзистентната испорака на производи и услуги со висок квалитет ја зајакнува довербата и ја унапредува репутацијата на организацијата;
- **Континуирано подобрување:** редовна евалуација на процесите со цел навремено откривање и надминување на слабости.

QMS не е само административен сет од процедури, туку основа за развој, контрола и подобрување на сите аспекти од работењето. Преку ефективна имплементација, организацијата гради основа за раст, иновации и одржлив успех.

9.3.1. Дигитализација на системот за управување со квалитет (eQMS)

Во современото дигитално опкружување сè поголем број фармацевтски и други регулаторни индустрии преминуваат од традиционални, хартиени системи на управување со квалитет кон дигитализирани платформи. Овие електронски системи за управување со квалитет (eQMS) нудат значајни предности во однос на ефикасност, прецизност и регулаторна усогласеност.

Предности на eQMS:

- **Намалување на време и грешки:** автоматизацијата на документирањето, проверките и известувањето го скратува времето и ја минимизира можноста за човечки пропусти;
- **Подобрена видливост и следливост:** централизираната евиденција со пристап во реално време овозможува ефикасно следење и анализа на процесите;
- **Зголемена безбедност на податоци:** пристапот базиран на улоги, енкрипцијата и ревизорските записи ја зголемуваат довербата во интегритетот на податоците (European Commission, 2022a);
- **Регулаторна усогласеност:** усогласувањето со меѓународни стандарди како GxP, 21 CFR Part 11 и ISO 9001 го олеснува инспекцискиот и ревизорскиот процес.

Клучни чекори при воведување eQMS:

- I. Анализа на постојниот систем и идентификација на потребите;
- II. Избор на соодветна дигитална платформа;
- III. Дефинирање и мапирање на процеси;
- IV. Тестирање, обука на персоналот и миграција на податоци;
- V. Пост-имплементациско следење и континуирано подобрување.

eQMS претставува значаен чекор кон проактивно, транспарентно и регулаторно усогласено управување со квалитетот (ICH Q10, 2007). Иако неговата имплементација бара иницијална инвестиција и значителен организациски ангажман, долгорочните придобивки (подобрена ефикасност, намален ризик и поголема усогласеност) ја прават оваа трансформација стратешки неопходна за модерните фармацевтски организации.

9.3.2. Видови системи за управување со квалитет

Системите за управување со квалитет претставуваат стратешки рамки преку кои организациите обезбедуваат и унапредуваат квалитет на своите производи, услуги и процеси. Во зависност од природата на организацијата, нејзината големина и индустриските барања, може да се применува еден или повеќе видови на QMS. Овие системи често се базираат на национални или меѓународни стандарди, при што секој пристап има свои специфики, предности и области на примена.

– **Стандардизирани системи за квалитет**

Најшироко прифатен систем е ISO 9001, кој дефинира барања за сеопфатен QMS. Овој меѓународен стандард поставува воедначени критериуми за управување со квалитет, насочени кон зголемување на задоволството на клиентите преку ефикасни процеси и континуирано подобрување. Сертифицираните организации демонстрираат дека работат според глобално признати практики, што ја зголемува довербата на пазарот и ги олеснува регулаторните и комерцијалните односи.

– **Тотално управување со квалитет**

Тоталното управување со квалитет (Total Quality Management – TQM) претставува филозофија на управување во која секој вработен е активно вклучен во подобрувањето на квалитетот на производите, услугите и внатрешните процеси. Основната идеја е создавање култура во која квалитетот е заедничка одговорност, а континуираното подобрување и задоволство на клиентите се клучни принципи во работењето.

– **Lean менаџмент**

Lean менаџментот се заснова на принципот на максимизирање на вредноста на клиентот преку елиминирање на сите облици на отпад и неефикасност. Со примена на алатки како мапирање на протокот на вредност (*Value Stream Mapping*) се идентификуваат непотребни чекори во процесите, што овозможува нивна оптимизација, скратување на времето и зголемување на ефикасноста.

– **Six Sigma**

Six Sigma е методологија заснована на квантитативна анализа и статистика, насочена кон намалување на варијациите и дефектите во производството и услугите. Оваа методологија, преку структурираниот пристап DMAIC (*Define, Measure, Analyze, Improve, Control*), има за цел постигнување исклучително ниска стапка на дефекти – максимум 3,4 на еден милион можности. Методологијата комбинира статистичка дисциплина со деловно размислување, што ја прави моќна алатка за зголемување на квалитетот и ефикасноста.

9.4. Придобивки од културата на квалитет

Воспоставувањето и негувањето на култура на квалитет носи бројни придобивки, како за фармацевтските компании така и за пациентите. Пред сè тоа резултира со повисок квалитет на производите, бидејќи сите вработени активно придонесуваат кон примена на највисоки стандарди во секојдневното работење. Со тоа се намалува фреквенцијата на дефекти, рекламации и повлекувања од пазарот, а во исто време се зголемува довербата на производите.

Фокусот на квалитетот директно ја зајакнува безбедноста на пациентите. Производството во согласност со принципите на GMP и примената на робусни системи за квалитет ја минимизираат веројатноста за грешки што би можеле да го загрозат здравјето на пациентите.

Дополнително, културата на квалитет е тесно поврзана со регулаторната усогласеност, овозможувајќи континуирано исполнување на националните и меѓународните стандарди и со тоа намалување на ризикот од санкции и зајакнување на кредибилитетот на компанијата.

Интеграцијата на квалитетот во сите процеси придонесува и за зголемена ефикасност и значителна заштеда на трошоци. Проблемите се идентификуваат и решаваат навремено, пред да предизвикаат доцнења, отпад или повторни процеси, што на долг рок обезбедува поголема продуктивност и одржливост на работењето.

Културата на квалитет претставува суштински елемент во современото управување со квалитет во фармацевтската индустрија. Нејзиното негување обезбедува систематско подобрување на процесите и гарантирање стабилен квалитет на производите.

Фармацевтските организации што применуваат QMS според ISO 9001 мора да поминат низ формализиран процес на сертификација, кој опфаќа неколку основни чекори:

- I. **Почетна анализа:** преглед на постојната документација и идентификација на недоследности;
- II. **Развој и имплементација на QMS:** подготовка на политики за квалитет, SOPs и евиденциски форми;

- III. **Интерни обуки и самоевалуација:** едукација на персоналот и спроведување пробни инспекции;
- IV. **Сертификациска инспекција од овластено тело (на пример, TÜV, SGS):** проверка на усогласеност, имплементација и ефективност;
- V. **Континуирано подобрување и следење:** редовни ревизии, активности поврзани со имплементација на корективни и превентивни мерки, ажурирање на документацијата.

9.5. Национална регулатива: Улогата на МАЛМЕД во GMP и QMS

Во Македонија примената и надзорот на GMP и QMS стандардите во фармацевтската индустрија се во надлежност на Агенцијата за лекови и медицински средства – МАЛМЕД. Оваа институција е одговорна за контрола, одобрување, инспекциски надзор и санкционирање на сите субјекти што учествуваат во производството, прометот и контролата на лекови.

Правната рамка за GMP/QMS во Македонија се темели на следниве прописи:

- Закон за лекови и медицински средства (Службен весник бр. 106/07 и измени);
- Правилник за добра производствена практика;
- Упатства за имплементација на GMP, усогласени со европските директиви.

МАЛМЕД спроведува редовни и вонредни GMP инспекции во сите лиценцирани фармацевтски капацитети, како и при поднесување барање за регистрација на лек (EMA, 2021). Инспекциите се вршат според воедначени контролни листи и резултираат со извештај за усогласеност, во кој евентуалните недостатоци се класифицираат како:

- критични недостатоци (critical);
- големи недостатоци (major);
- мали отстапки (minor).

Покрај инспекциската функција, МАЛМЕД има клучна улога и во:

- одобрување на QMS-поврзани процедури за нови производни линии;
- издавање GMP сертификати за домашни и странски партнери;
- надзор на системот за фармаковигиланца, квалитетот на амбалажата и условите за складирање на лековите;
- поддршка на дигитализацијата и развој на електронски платформи за пријава на OOS, OOE и девијации.

Во последните години МАЛМЕД презеде значајни чекори за унапредување на GMP инспекциите преку процес на дигитална трансформација. Воведена е електронска евиденција на документација (e-DMS), со што се овозможува систематизирано и транспарентно управување со податоците. Понатаму, интегрирана е можност за онлајн пријава на OOS резултати, што ја зголемува ефикасноста и ја намалува можноста за задоцнувања во комуникацијата. Дополнително, воспоставен е нов модул за фармаковигиланца кој овозможува автоматизирано следење и известување за безбедноста на лековите. Како дел од идните активности се предвидува интеграција со e-GMP модули кои ќе овозможат автоматска проценка на ризик врз основа на сервиски податоци и индикатори за квалитет.

9.6. Фармаковигиланца и управување со ризик во рамки на QMS

Фармаковигиланцата е клучна компонента на системот за управување со квалитет во фармацевтската индустрија. Таа опфаќа следење, проценка и преземање мерки за несаканите дејства од лековите по нивното одобрување и пуштање во промет.

Во рамките на QMS, системот за фармаковигиланца треба да обезбеди:

- стандарден процес за собирање и пријавување несакани дејства;
- редовна проценка на ризик-бенефит соодносот на производитите;

- соработка со здравствени работници и пациенти при детекција на сигнали (препознавање можни ризици врз основа на податоци од реална употреба на лековите);
- подготовка на редовни периодични извештаи за безбедност (Periodic Safety Update Reports – PSUR);
- воспоставување план за управување со ризик (Risk Management Plan – RMP).

Управувањето со ризик претставува проактивен процес на идентификација, анализа, контрола и следење на потенцијалните ризици поврзани со квалитетот и безбедноста на лекот (ICH Q9(R1), 2023).

Според меѓународно прифатениот водич ICH Q9, управувањето со ризик вклучува:

- **идентификација на ризици**: препознавање на можни фактори кои влијаат врз квалитетот, ефикасноста или безбедноста на лековите;
- **анализа на ризици**: проценка на веројатноста и сериозноста на можните последици;
- **контрола на ризици**: воспоставување мерки за намалување или елиминирање на идентификуваните ризици;
- **комуникација и следење**: размена на информации со релевантни страни и проверка на ефективност на мерките (ICH Q9(R1), 2023).

Современиот концепт на фармаковигиланца не се сведува само на пасивна регистрација на несакани дејства, туку вклучува активно следење на бази на податоци, препознавање можни ризици врз основа на податоци од реалната употреба на лековите, како и примена на стратегии за управување со ризици. Пример за тоа е EudraVigilance системот во Европската Унија, кој овозможува интегрирана размена на информации и тесна соработка помеѓу здравствените професионалци.

Во Македонија сите производители и носители на дозвола за лек се обврзани да именуваат QPPV (Qualified Person for Pharmacovigilance) – одговорно лице за фармаковигиланца, кое ја води евиденцијата, го обучува персоналот и подготвува извештаи.

Имплементацијата на систем за фармаковигиланца и управување со ризик е задолжителна во согласност со регулаторните барања на МАПМЕД, ЕМА и FDA. Тие се нераскинлив дел од еден ефективен QMS и предуслов за заштита на јавното здравје.

9.7. Примери од инспекциски надзори и регулаторни предупредувања

Во еден случај неусогласеност во мониторингот на чистота во класа 100 зона довела до сериозна контаминација и отповикување на 20 серии производ. По спроведената анализа за примена на корективни и превентивни мерки, компанијата имплементирала автоматизиран систем за HVAC следење и далечински алармен механизам.

Во изминатите години регулаторните тела како FDA и ЕМА издале бројни предупредувања за забележани неусогласености при GMP инспекции (ЕМА, 2021).

Два карактеристични примера се:

- I. *FDA предупредување до компанија во Индија (2022)*:
 - Недоволна документација за OOS резултати;
 - Недостиг на валидација на метод за микробиолошка анализа;
 - Недостаток на следливост на серии и необучен персонал.
- II. *ЕМА извештај за GMP прекршок во Европската Унија (2021)*:
 - Неадекватен систем за контрола на промени;
 - Примена на застарени SOPs без редовен преглед;
 - Недокументирани интервенции во чисти зони.

Во контекст на управувањето со ризик, според ICH Q9 водичот, често се применуваат алатки како FMEA (Failure Mode and Effects Analysis), Fishbone дијаграми и HACCP принципи. Овие пристапи овозможуваат визуализација на критични точки, анализа на веројатноста и влијанието на потенцијални ризици, како и дефинирање на соодветни контроли.

Современата пракса покажува дека сè поголем број фармацевтски компании применуваат дигитални платформи кои автоматски генерираат ризик-профили врз основа на отстапки, рекламации и трендови во анализите за контрола на квалитет. На овој начин се овозможува проактивен пристап кон превенција, навремено управување со ризиците и повисоко ниво на усогласеност со регулаторните барања.

9.8. Предизвици за развивање култура на квалитет

Воспоставувањето култура на квалитет е процес што бара длабоки промени во начинот на функционирање на организацијата. Иако придобивките се јасни и значајни, организацијата при овој процес се соочува со повеќе предизвици.

– Културна промена

Развивањето на култура на квалитет подразбира трансформација на размислувањето, вредностите и однесувањето на сите нивоа во организацијата. Често се јавува отпор од страна на вработените, особено ако долго време се потпирале на традиционални практики и методи на работа. За надминување на овој отпор потребни се јасна визија, силно лидерство и активно вклучување на сите засегнати страни.

– Ангажирање и обука на вработените

Клучен елемент во процесот е активното учество на секој вработен. За да се постигне ова, неопходни се програми за континуирана едукација и развој, ефективни комуникациски стратегии и создавање свест за тоа дека квалитетот не е само техничка, туку и колективна одговорност. Само добро обучени и мотивирани вработени можат да придонесат кон одржлива култура на квалитет.

– Алоцирање на ресурси

Имплементацијата на култура на квалитет најчесто бара дополнителни вложувања - од нова технологија и модернизација на инфраструктурата, па сè до специјализирана обука на персоналот. За мали и средни компании овие барања често претставуваат сериозен финансиски товар. Затоа е потребно стратешко планирање и рационално користење на достапните ресурси, со јасна визија за долгорочната корист од инвестициите.

Во целина, културата на квалитет и примената на GMP претставуваат основни столбови на фармацевтската индустрија во XXI век. Тие не само што гарантираат квалитетни и безбедни производи за пациентите, туку обезбедуваат и стабилност и углед на фармацевтските компании. Во услови на глобална регулаторна транспарентност и дигитален надзор, културата на квалитет повеќе не е опција, туку императив. GMP и QMS овозможуваат кохерентна, документирана и контролирана средина за производство, претставувајќи регулаторна и системска основа за сигурност, доследност и долгорочен успех.

9.9. Сертификација од страна на квалификувано лице и пуштање на серија лек во промет

Во фармацевтската регулатива крајната одговорност за перформансите на лекот во текот на неговиот цел животен циклус ја има носителот на одобрението за ставање на лекот во промет (Marketing Authorization Holder – MAH) (European Parliament and Council of the European Union, 2001). Ова подразбира следење на лекот од фазата на производство, преку дистрибуцијата, па сè до неговата конечна употреба од страна на пациентот.

Сепак, покрај оваа севкупна одговорност на МАН, клучна улога има и квалификуваното лице (Qualified Person – QP) кое е задолжено за сертификација на секоја поединечна серија (European Commission, 2022c). Всушност, QP потврдува дека:

- серијата е произведена и контролирана во согласност со одобрието за ставање во промет;
- испочитувани се сите барања на GMP;
- серијата е усогласена со националните и европските прописи на земјата-членка каде што се врши сертификацијата.

Процесот на ослободување на една серија на лек вклучува три главни фази:

- I. **Проверка на производството и контролата на квалитетот:** Прво се врши детална проверка на производниот процес и резултатите од контролата на квалитет. Ова опфаќа темелен преглед на сите релевантни документи и лабораториски податоци за да се потврди дека серијата е произведена и тестирана според однапред дефинирани и валидирани процедури;
- II. **Сертификација од QP:** По успешната техничка проверка, QP ја извршува сертификацијата на серијата. Со ова се потврдува дека производството е во согласност со GMP и дека серијата ги исполнува сите услови од одобрието за ставање на лекот во промет. Овој чекор претставува т.н. *ослободување на серијата од аспект на квалитет*;
- III. **Пласирање на пазарот и/или извоз:** Откако серијата е сертифицирана, таа може да се пласира на пазарот или да се извезе. Ако физичката испорака се врши од различна локација од онаа каде што е извршена сертификацијата, мора да постои писмен договор помеѓу вклучените страни. Во овој договор јасно се дефинираат одговорностите и процедурите за усогласеност со сертификацијата.

Контролата на ослободувањето има суштинско значење за системот за обезбедување квалитет. Нејзината цел е да обезбеди дека:

- секоја серија е усогласена со важечкото одобрение за ставање во промет;
- производството и контролата се спроведени во согласност со GMP принципите и упатствата;
- земени се предвид сите други релевантни регулаторни барања.

Дополнително, во ситуации на сомнеж за дефект во квалитетот (на пример, според Поглавје 8 од EudraLex, Том 4, Дел I) или, пак, кога постои потреба од повлекување на серија од пазарот, системот мора да овозможи брза идентификација на квалификувани лица што учествувале во сертификацијата, како и навремен пристап до релевантните записи за серијата.



Слика 19. Ослободување на серија лек во промет (автор)

9.9.1. Процес на сертификација на серија лек

Секоја серија на готов фармацевтски производ што се пушта во промет на територијата на Европската Унија мора задолжително да биде сертифицирана од страна на QP, пред нејзино продавање, снабдување или извоз (European Commission, 2022c). Сертификацијата претставува законска обврска и формална потврда дека серијата е произведена, тестирана и оценета во согласност со барањата на важечките прописи, со принципите на GMP, како и со условите на одобрението за ставање во промет.

Оваа одговорност му припаѓа исклучиво на QP, вработено кај производителот или увозникот наведен во одобрението. QP мора да има целосно познавање на сите фази од производниот процес за кои презема одговорност и треба континуирано да ги надградува своите знаења преку обука поврзана со карактеристиките на производот, технологиите на производство и актуелните GMP стандарди.

Честопати една серија може да помине низ повеќе фази на производство, тестирање или складирање на различни локации. Сепак, QP што ја врши финалната сертификација мора да потврди дека сите релевантни активности се изведени во согласност со системите за квалитет и со законските барања. За секоја вклучена локација мора да постои формален договор со јасно дефинирани обврски. Доколку на одредена локација се изведуваат само дел од операциите (на пример, пакување или анализа), тогаш QP на таа локација мора да потврди усогласеност со GMP стандардите за тие операции. Финалната сертификација може да биде извршена од едно QP или поделена меѓу повеќе QP, под услов таа распределба да биде формално документирана и во согласност со одобрението за производство и увоз (Manufacturing and Importation Authorization – MIA).

Кога лековите се произведуваат надвор од Европската Унија, процесот на увоз и сертификација се смета за последна производна фаза. QP има обврска да потврди дека секоја серија, без разлика на нејзиното потекло, е произведена и тестирана во согласност со GMP и со одобрението за ставање во промет. Во случаи кога не постои договор за заемно признавање меѓу Европската Унија и земјата извозник, QP мора да гарантира дека серијата е подложена на целосна квалитативна и квантитативна анализа на активните супстанции, како и на дополнителни тестови во одредена земјачленка на Европската Унија.

Особено внимание се посветува на мострите кои мора бидат целосно репрезентативни за серијата. Тие можат да се земаат по пристигнувањето во Европската Унија или во земјата на потекло, доколку постои техничко оправдување. Во ваков случај мора да се спроведе формален процес на управување со ризик, кој опфаќа ревизија на локацијата, анализа на транспортните услови и докази дека земените мостри навистина се репрезентативни. Ако неочекуван резултат покаже отстапување од спецификациите, тоа се третира како потенцијален дефект во квалитетот, согласно EudraLex, Том 4, Поглавје 8.

Понекогаш повеќе готови серии може да потекнуваат од иста балк серија. Во такви случаи QP може да ја базира сертификацијата на дополнителните серии врз основа на резултатите од првата, доколку тоа е оправдано преку управување со ризик и се обезбедени докази за интегритетот, стабилноста и идентитетот на производот.

Пред финалното потпишување на сертификацијата, QP мора да потврди дека се исполнети сите предуслови наведени во MIA, дека се испочитувани дополнителните национални барања и дека е достапна валидна документација. Исто така, QP мора да потврди дека синцирот на снабдување целосно е документиран, дека производните и контролни активности се усогласени со одобрението за ставање во промет, дека сите употребени материјали ги исполнуваат барањата, дека персоналот е соодветно обучен, дека процесите се валидирани, а сите записи се потврдени и прегледани.

Сертификацијата се евидентира во регистар или друг систем кој мора да биде достапен најмалку пет години за увид од надлежните органи. Овие записи служат како доказ за усогласеност со Директивата 2001/83/EЗ (за лековите за хумана употреба) или

2001/82/E3 (за лековите за ветеринарна употреба) (European Parliament and Council of the European Union, 2001).

Во случаи на паралелен увоз или дистрибуција, доколку серијата е повторно пакувана пред нејзината нова сертификација, QP мора да потврди дека сите операции се спроведени во согласност со националните и европските правила и дека повторно пакуваната серија е усогласена со релевантното овластување и GMP. За специфични категории на лекови, како биолошки лекови или радиофармацевтици, може да се применуваат дополнителни упатства и барања наведени во прилозите на EudraLex.

9.9.2. Справување со неочекувани отстапувања во процесот на сертификација

Иако една серија на лек може целосно да ги исполнува регистрираните спецификации за активната супстанција, ексципиентите, примарните и секундарните материјали за пакување, како и за крајниот производ, сепак може да се појават неочекувани отстапувања во текот на производството или контролата на квалитет. Таквите ситуации претставуваат отстапување од условите наведени во одобрението за ставање во промет и/или од GMP принципите.

Во овие случаи QP може да размисли за сертификација на серијата само доколку отстапувањето е темелно истражено, основната причина е идентификувана и соодветно коригирана, а ризикот за квалитетот, безбедноста и ефикасноста на производот е целосно проценет и оправдан. Доколку отстапувањето е со траен карактер, може да биде потребно поднесување на варијација на постојното одобрение за ставање во промет, со цел усогласување на новите производни околности со регулаторните барања.

Секое неочекувано отстапување мора да се обработи преку QMS, користејќи процес на управување со ризик за квалитет, како што е опишано во Дел III од Водичот за GMP. Во овој случај, управувањето со ризик треба да вклучува евалуација на потенцијалното влијание врз квалитетот, безбедноста и ефикасноста на конкретната или на повеќе серии. Само доколку влијанието се оцени како занемарливо, може да се пристапи кон сертификација. Дополнително, потребно е да се разгледа можноста за вклучување на серијата во програмата за стабилност, особено ако постои сомнеж дека отстапувањето може да влијае врз долгорочната стабилност на производот. Кај биолошките лекови секое отстапување од одобрениот производен процес мора да се разгледува со особено внимание, бидејќи дури и мали промени можат да предизвикаат значителни и неочекувани ефекти врз безбедноста и ефикасноста.

Кога производството и контролата на серијата се изведуваат на различни локации, а во сертификацијата се вклучени повеќе квалификувани лица, лицето кое ја врши финалната сертификација мора да биде целосно информирано за сите релевантни отстапувања и да ги земе предвид при донесување на конечната одлука. Ова е особено важно во случаи кога отстапувањата можат да влијаат врз усогласеноста со GMP стандардите или усогласеноста со одобрението за ставање во промет.



Слика 20. Справување со неочекувани отстапувања во процесот на сертификација (автор)

Секое пуштање на серија лекови на пазарот мора строго да се изведува во согласност со регулаторните барања, при што клучна улога има QR. Серијата не смее да се пушти во промет без формална сертификација со која QR потврдува дека таа е произведена и контролирана во согласност со GMP и со одобрението за производство и увоз.

Додека трае процесот на сертификација серијата мора да остане на местото на производство или да биде префрлена на претходно одобрена локација од страна на надлежниот регулаторен орган. Во овие случаи мора да бидат преземени мерки за спречување на неовластено или предвремено ослободување на серијата. Овие мерки можат да бидат физички (како одвоено складирање и јасно обележување со соодветни етикети) или електронски (преку употреба на валидирани компјутеризирани системи за следење и контрола).

Доколку несертифицирана серија се пренесува од една до друга овластена локација, мора строго да се задржи интегритетот на карантинскиот статус, со што се спречува случајно и неовластено ослободување.

Покрај тоа, потребно е формализирање на процесот на известување за сертификација на серијата. Известувањето од QR мора да биде формално, јасно и во согласност со барањата наведени во Поглавје 4 од EudraLex, Том 4, Дел I. Само по оваа потврда серијата може да се пренесе во залиха за дистрибуција или продажба.

Со воспоставување вакви строго контролирани процеси се обезбедува висок степен на доверба во безбедноста, ефикасноста и квалитетот на лековите што се пласираат на пазарот.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Abendroth, R., & Clark, R. (1992). Glass containers for parenterals. In K. Avis, H. Lieberman, & L. Lachman (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. I* (pp. 173–248). New York: Marcel Dekker.
- Adamovics, J. (Ed.). (1996). *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals* (2nd ed.). New York: Dekker.
- Adeyeye, C., & Li, P. (1985). Diclofenac sodium. In *Analytical profiles of drug substances* (Vol. 19, pp. 123–144). New York: Academic Press.
- Ahuja, S., & Scypinski, S. (Eds.). (2001). *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. San Diego: Academic Press.
- Altria, K., & Bestford, J. (1996). Main component assay of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: considerations regarding precision, accuracy, and linearity data. *Journal of Capillary Electrophoresis*, 3(1), 13–23.
- Altria, K., Traylen, E., & Turner, N. (1995). Analysis of dissolution test sample solutions by high speed capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 41(7–8), 393–397.
- Andrews, R., & Richardson, H. (1994). Effect of spectral resolution, detector linearity and chromatographic resolution on peak purity calculations. *Journal of Chromatography*, 683, 3–8.
- Avis, K., Lieberman, H., & Lachman, L. (Eds.). (1992). *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vols. I–III*. New York: Marcel Dekker.
- Banes, D. (1974). *A Chemist's Guide to Regulatory Drug Analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Barhan, D., & Trinder, P. (1972). An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *The Analyst*, 97, 142–152.
- Barnett, V., & Lewis, T. (1994). *Outliers in Statistical Data* (3rd ed.). New York: Wiley.
- Budavari, S. (Ed.). (1996). *The Merck Index* (12th ed.). Rahway, NJ: Merck.
- Chafetz, L. (1971). Stability indicating assay methods for drugs and their dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60, 335–345.
- D'Arcy, P., & Harron, D. (Eds.). (1992). *Proceedings of the First International Conference on Harmonisation, Brussels, 1991*. Belfast: Queen's University of Belfast.
- D'Arcy, P., & Harron, D. (Eds.). (1994). *Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation, Orlando, 1993*. Belfast: Queen's University of Belfast.
- D'Arcy, P., & Harron, D. (Eds.). (1996). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Yokohama, 1995*. Belfast: Queen's University of Belfast.
- Dean, R., & Dixon, W. (1951). Simplified Statistics for Small Numbers of Observations. *Analytical Chemistry*, 23(4), 636–638.
- Dorsey, J., Cooper, W., Siles, B., & Barth, H. (1998). Liquid chromatography: theory and methodology. *Analytical Chemistry*, 70, 591R–644R.
- European Commission. (2020). *EudraLex – Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice – Annex 15: Qualification and Validation*. Brussels: European Commission.
- European Commission. (2022). *EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines. Part I: Basic Requirements for Medicinal Products; Annex 16: Certification by a Qualified Person and Batch Release*. Brussels: European Commission. Retrieved from https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-03/annex16_2022_en_0.pdf
- European Commission. (2022). *EudraLex – Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice – Annex 11: Computerised Systems*. Brussels: European Commission.
- European Commission. (2022). *EudraLex – Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Part I: Basic Requirements for Medicinal Products*. Brussels: European Commission.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2020). *OMCL Guideline: Documentation in OMCLs*. Strasbourg: EDQM.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2020). *OMCL Guideline: Validation of Computerised Systems*. Strasbourg: EDQM.

- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2021). *OMCL Guideline: Evaluation of Analytical Results*. Strasbourg: EDQM.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2022). *OMCL Guideline: Archiving of Documents*. Strasbourg: EDQM.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2022). *OMCL Guideline: Specifications for the Testing of Medicines within the OMCL Network*. Strasbourg: EDQM.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2022). *OMCL Network Guideline: Validation/Verification of Analytical Procedures*. Strasbourg: EDQM.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty – Annex 1: Bottom-up approach – Annex 1.1: Estimation of measurement uncertainty of concentration of solutions prepared in laboratory PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR*. Retrieved from Council of Europe – EDQM: <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty – Annex 2: Top-down approach – Annex 2.3: Use of certified reference materials PA/PH/OMCL (18) 151 R1 CORR*. Retrieved from <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
- European Medicines Agency. (2021). *Compilation of Union procedures on inspections and exchange of information (EMA/INS/GMP/641302/2021 Rev. 20)*. Amsterdam: EMA. Retrieved from <https://www.ema.europa.eu>
- European Parliament and Council of the European Union. (2001). *Directive 2001/83/EC of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use*. Official Journal of the European Union.
- European Pharmacopoeia Commission. (2024). *European Pharmacopoeia*. Strasbourg: Council of Europe.
- Federal Register. (1997). *Control of drug impurities*.
- Food and Drug Administration (FDA). (1996). *Guideline for industry: Impurities in new drug substances*. Washington, DC: FDA.
- Fowler, J., Gottesman, J., Reid, C., Andriole, G., & Soloway, M. (2000). Safety and efficacy of an implantable leuprolide delivery system in patients with advanced prostate cancer. *Journal of Urology*, 164, 730–734.
- Fyfe, C., Grondey, H., Blazek-Welsh, A., Chopra, S., & Fahie, B. (2000). NMR imaging investigations of drug delivery devices using a flow-through USP dissolution apparatus. *Journal of Controlled Release*, 68, 73–83.
- Ganderton, D. (1999). Targeted delivery of inhaled drugs: current challenges and future goals. *Journal of Aerosol Medicine*, 12(1), S3–S8.
- Gilpin, R., & Pachla, L. (1999). Pharmaceutical and related drugs. *Analytical Chemistry*, 71, 217R–233R.
- Guiffre, R. (1993). The use of diode-array detectors in the pharmaceutical industry. In *Chromatographic Science Series* (Vol. 62, pp. 163–197).
- Hicke, B., Chang, Y.-F., Gould, T., Stephens, A., Warren, S., & Schmidt, P. (1999). Tumor targeting by an aptamer. *AAPS PharmSci*, 1(4). doi:10.1208/ps010429
- Hickey, P., Longridge, D., McCrossin, L., Bellhouse, B., & Ashcroft, S. (1998). Administration of insulin via dermal Powderject—reproducible and dose-dependent delivery to the anesthetized rat. *AAPS PharmSci*, 1(1).
- Hussain, A. A., Dakkun, A., & Itoh, S. (1999). Nasal absorption of ondansetron: An alternative route of drug delivery for nausea control. *AAPS PharmSci*, 1(4).
- International Conference on Harmonisation (ICH). (1996). *Q3B: Impurities in New Drug Products. Guidance for industry*. Retrieved from <https://www.ich.org>
- International Council for Harmonisation (ICH). (1999). *ICH Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products*. Geneva: ICH.

- International Council for Harmonisation (ICH). (2003). *ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- International Council for Harmonisation (ICH). (2005). *ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- International Council for Harmonisation (ICH). (2005). *ICH Q8(R2): Pharmaceutical Development*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- International Council for Harmonisation (ICH). (2007). *ICH Q10: Pharmaceutical Quality System*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- International Council for Harmonisation (ICH). (2023). *ICH Q9(R1): Quality Risk Management*. Geneva: ICH. Retrieved from <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- International Organization for Standardization (ISO). (2017). *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva: ISO.
- Jenkins, P. G. (1999). The mucosal delivery of vaccines and DNA. *AAPS PharmSci*, 1(4).
- Kaushik, S., McAllister, D. V., Simtra, S., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated microneedles for transdermal drug delivery. *AAPS PharmSci*, 1(4).
- Kelly, M., Clark, B., & Altria, K. (1998). Investigation into the effects of sample dissolving solvents and sample matrices on the separation obtained in capillary electrophoresis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 21, 193–196.
- Krstulovic, A., & Lee, C. (1997). Defining drug purity through chromatographic and related methods: Current status and perspectives. *Journal of Chromatography B*, 689(1), 137–153.
- Kunkel, G., Magnussen, H., Bergmann, K., Juergens, U. R., de Mey, C., Freund, E., . . . Beckers, B. (2000). Respimat (a new soft mist inhaler) delivering fenoterol plus ipratropium bromide provides equivalent bronchodilation at half the cumulative dose compared with a conventional metered dose inhaler in asthmatic patients. *Respiration*, 67, 306–314.
- Luch, J. (1985). Metoprolol tartrate. In K. Florey (Ed.), *Analytical profiles of drug substances* (Vol. 12, pp. 325–356). New York: Academic Press.
- Marbach, E., & Well, M. (1967). Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clinical Chemistry*, 13, 314–325.
- March, J. (1992). *Advanced organic chemistry*. New York: Wiley.
- Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). (2014). *Guidance on Investigations of Out of Specification (OOS) Test Results*. London: MHRA.
- Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). (2018). *GxP Data Integrity Guidance and Definitions*. London: MHRA.
- Mehrotra, S., Kalyan, P. B., Nayak, P. G., Joseph, A., & Manikkath, J. (2023). Recent progress in the oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Overview of pharmaceutical strategies to overcome absorption hurdles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 14(1), 11–33. doi:10.34172/apb.2024.009
- Mitchell, J., & Palermo, P. (1999). *Patent No. 09/316,862; WO 99/62097*.
- National Institute of Standards and Technology (NIST/SEMATECH). (2012). *e-Handbook of Statistical Methods*. Retrieved from <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>
- Nicolaou, K., & Sorenson, E. (1996). *Classics in total synthesis*. New York: VCH.
- Pavia, D., & Moonen, D. (1999). Preliminary data from phase II studies with Respimat, a propellant-free soft mist inhaler. *Journal of Aerosol Medicine*, 12(1), S33–S39. doi:10.1089/jam.1999.12.s1-33
- Rajabi-Siahboomi, A., Bowtell, R., Mansfield, P., Davies, M., & Melia, C. (1996). Structure and behavior in hydrophilic matrix sustained-release dosage forms: 4. Studies of water mobility and diffusion coefficients in the gel layer of HPMC tablets using NMR imaging. *Pharmaceutical Research*, 13(3), 376–377.
- Riley, C., & Rosanke, T. (1996). *Development and Validation of Analytical Methods*. Amsterdam: Elsevier Science.

- Shikanov, A., Shikanov, S., Vaisman, B., Golenser, J., & Domb, A. J. (2008). Paclitaxel tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1–2), 114–120. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.02.028
- Sievert, H., & Drouen, A. (1993). Spectral matching and peak purity. In *Chromatographic Science Series, Vol. 62* (pp. 51–126).
- Smith, E., & Nash, R. (1992). Elastomeric closures for parenterals. In K. Avis, H. Lieberman, & L. Lachman (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1* (pp. 173–248). New York: Marcel Dekker.
- Stenport, V. F., Olsson, B., Morberg, P., Törnell, J., & Johansson, C. B. (2001). Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: An experimental study in the rabbit. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 3(3), 135–141. doi:10.1111/j.1708-8208.2001.tb00133.x
- Strickley, R. (1999). Parenteral formulations of small molecule therapeutics marketed in the United States. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 53, 324–349.
- Sweetana, S., & Akers, M. (1996). Solubility principles and practices for parenteral dosage form development. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 50, 330–342.
- Ulbricht, R., Northup, S., & Thomas, J. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, 843–853.
- United States Pharmacopeia. (1999). *USP 24*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- United States Pharmacopeia. (2000). Dextrose Injection. Official Monograph. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- United States Pharmacopeia. (2000). Physical Tests <661> Containers. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- United States Pharmacopeia. (2000). *USP 23*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- Weisner, W. (1998). Developing analytical methods for stability testing. *Pharmaceutical Technology*, 20–29.
- Weiss, M., Steiner, D. F., & Philipson, L. H. (2014). Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. In K. R. Feingold, S. F. Ahmed, & B. Anawalt (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
- Weston, A., & Brown, P. (1997). *HPLC and CE: Principle and Practice*. San Diego: Academic Press.
- World Health Organization (WHO). (2021). *Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP) for Pharmaceutical Products*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO). (2021). *WHO Guidelines on Good Data and Record Management Practices*. Geneva: World Health Organization.
- Zierenberg, B. (1999). Optimizing the in vitro performance of Respimat. *Journal of Aerosol Medicine*, 12(1), S19–S24. doi:10.1089/jam.1999.12.s1-19

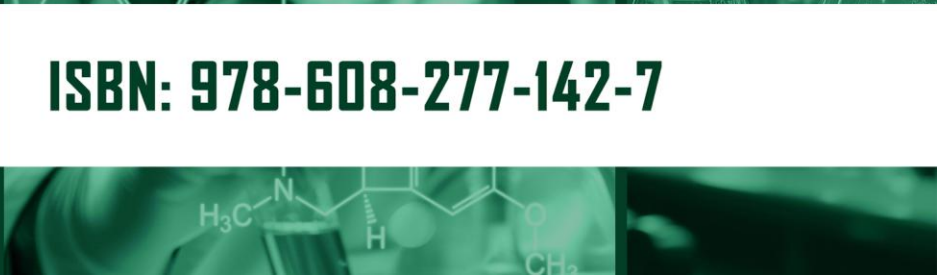
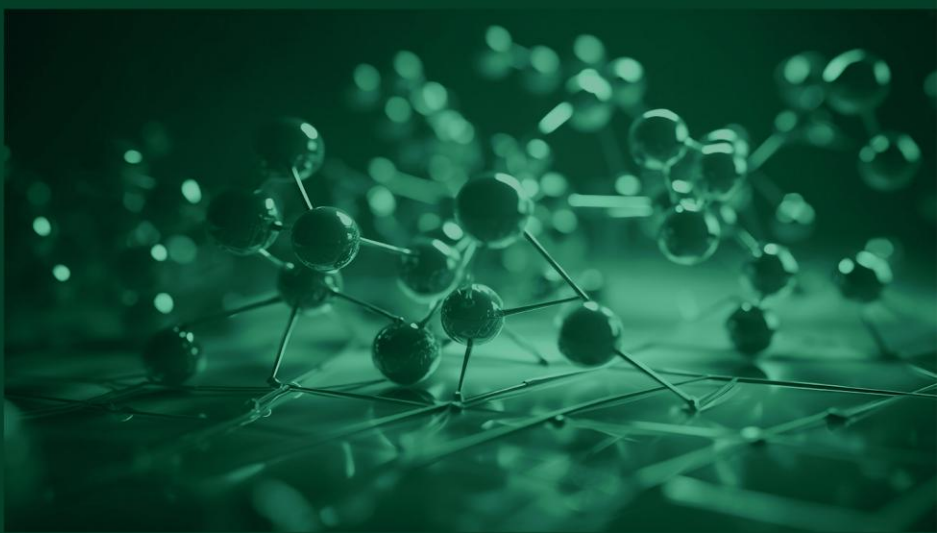
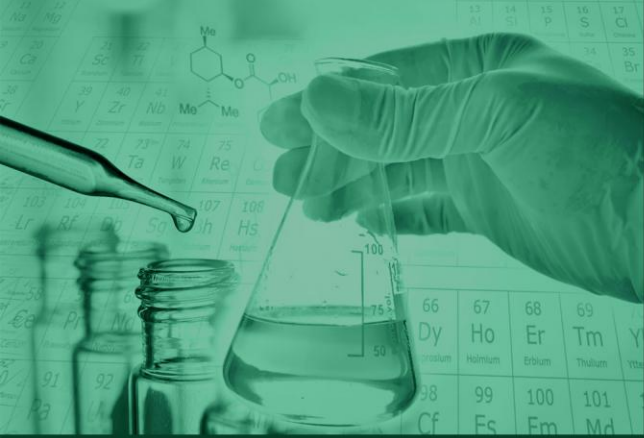
БИОГРАФСКИ ПОДАТОЦИ

Доц. д-р Ивана Митревска е родена на 21.7.1984 година во Скопје. Основното и средното образование ги завршила во родниот град. Своите додипломски студии ги завршила на Фармацевтскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, стекнувајќи се со академското звање магистер по фармација. Во 2008 година го положила стручниот испит пред Испитната комисија на Фармацевтската комора на Македонија, а во 2013 година пред Испитната комисија на Фармацевтскиот факултет полагала специјалистички испит по специјалноста Испитување и контрола на лекови и се стекнала со звање специјалист по испитување и контрола на лекови. Докторирала во 2020 година, со одбрана на докторската дисертација со наслов „Споредба на *in vitro* профили на растворливост со примена на конвенционални и мултиваријантни статистички методи“, стекнувајќи се со титулата доктор на фармацевтски науки.

Почнувајќи од јули 2007 година, доц. д-р Ивана Митревска е вработена во „Алкалоид“ АД Скопје, најпрво како аналитичар во Профитен центар Контрола на квалитет – фармација, а потоа и како истражувач во Одделот за аналитички развој, истражување и развој. Од декември 2011 година е на работно место помлад истражувач во Одделот за аналитички развој, истражување и развој при „Алкалоид“ АД Скопје, а од јануари 2018 година работи како постар/специјалист истражувач во одделот Технички операции, истражување и развој, истовремено раководејќи со тимот за следење на стабилноста на нови производи и производи во животен циклус. Во 2023 година е назначена за раководител на Одделот за стабилност при Институтот за истражување и развој, а од 2024 година станала и носител на дозвола за пуштање на серија лек во промет во рамките на Обезбедување на квалитет како клучно, квалификувано лице. Во овој период работи и како раководител на Одделот за ослободување на серија лек цефалоспорински *in house* производи.

Во текот на својот професионален и стручен развој, доц. д-р Ивана Митревска финализирала повеќе обуки и едукации во нејзината област, како и одредени апликативни тренинзи. Како резултат на нејзината досегашна научно-истражувачка работа, објавила повеќе научни трудови и истите ги презентирала на домашни и меѓународни конференции.

Член е и на Фармацевтската комора на Република Северна Македонија.



ISBN: 978-608-277-142-7