

УДК: 615.451: 615.07: 543.42.062

Л.І. Вишневська, М.С. Вишневська, К.О. Хохлова

Національний фармацевтичний університет

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ В ОРАЛЬНИХ КРАПЛЯХ УРОХОЛ

Проведено валідацію методики кількісного визначення флавоноїдів у складних краплях для урології методом спектрофотометрії. У ході проведення дослідження були визначені основні валідаційні параметри: робасність, лінійність, правильність, прецизійність на всьому діапазоні застосування методики. Отримані результати свідчать про те, що наведена методика відповідає сучасним критеріям до аналітичних методик кількісного визначення і дозволяє об'єктивно визначити вміст суми флавоноїдів у розробленому лікарському препараті.

Ключові слова: валідація, лікарська рослинна сировина, флавоноїди, спектрофотометрія, рутин

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

У наш час приділяється велика увага питанням якості лікарських препаратів, у тому числі, з лікарської рослинної сировини. Вивчення літературних даних показало, що актуальним є напрямок стандартизації комплексних фітопрепаратів [1, 3, 8].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

У результаті проведеної попередньої роботи, нами була розроблена методика кількісного визначення діючих речовин препарату урохолу — суми флавоноїдів, з використанням методу спектрофотометрії. Здатність фенольних сполук поглинати в УФ-області обумовлює використання даного методу для стандартизації лікарської рослинної сировини та її препаратів [1, 3, 8].

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Вимоги Державної Фармакопеї України (ДФУ) вимагають обов'язкове проведення валідації всіх аналітичних методик, з метою забезпечення необхідної якості та безпечності лікарських препаратів [2].

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи було проведення валідації методики кількісного визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин у комплексному рослинному препараті для урології. Для вирішення цього завдання нами були вивчені такі валіда-

ційні параметри: специфічність, робасність, діапазон застосування методики, лінійність, прецизійність (збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність), правильність [2, 3, 5, 6, 7].

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Методика кількісного вмісту суми флавоноїдів. 8,0 мл препарату поміщали в мірну колбу ємністю 25 мл і розводили спиртом (70%, об/об) Р до мітки, перемішували та центрифугували зі швидкістю 5000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину фільтрували через вату (розчин А).

1,0 мл розчину А поміщали у мірну колбу ємністю 25 мл, додавали близько 10 мл спирту (70%, об/об) Р, 2 мл розчину 50 г/л алюмінію хлориду Р у спирті (70%, об/об) Р, перемішували. Через 10 хв додавали 2 мл суміші: оцтова кислота льодяна Р – спирт (70%, об/об) Р (5:95), доводили об'єм розчину спиртом (70%, об/об) Р до мітки і перемішували (розчин Б).

Через 40 хв вимірювали оптичну густину розчину Б на спектрофотометрі при довжині хвилі 408 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

В якості компенсаційного розчину використовували суміш: 1,0 мл розчину А та 2 мл суміші: оцтова кислота льодяна Р – спирт (70%, об/об) Р (5:95), доведену спиртом (70%, об/об) Р до об'єму 25,0 мл.

Вміст суми флавоноїдів у 1 мл препарату (Х), в перерахунку на рутин, розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \times 25 \times 25 \times 10}{220 \times 8 \times 1} = A \times 3,551 ,$$

© Л.І. Вишневська, М.С. Вишневська, К.О. Хохлова, 2010

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

$220 (A_{1\text{см}}^{1\%})$ – питомий показник поглинання комплексу рутину з алюмінію хлоридом у даних умовах за довжини хвилі 408 нм.

Вміст суми флавоноїдів в 1 мл препарату, у перерахунку на рутин, має бути не менше 1,5 мг.

Для роботи нами був використаний препарат урохол серії № 30908. Кількісне визначення проводили методом тонкошарової хроматографії з використанням *ТШХ пластинок із шаром силікагелю Р*, розміром 10×15см, у системі *етилацетат Р – мурашина кислота безводна Р – оцтова кислота льодяна Р – вода Р (100:11:11:26)*. Встановили, що головними компонентами суми флавоноїдів, наявними у досліджуваних краплях складних, є рутин та ізокверцитрин.

Спектри поглинання знімали на спектрофотометрі «Specord-200» у діапазоні довжин хвиль 380-430 нм. Визначення проводили методом абсорбційної спектрофотометрії у видимій області (ДФУ, 2.2.25N). У ході проведення роботи використовували ваги аналітичні Kern ABJ 220-4M, мірний посуд класу А (першого класу), який від-

повідає вимогам ДФУ. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [2].

Аналітичний розчин має максимум поглинання при 408 нм ± 2 нм, який співпадає з максимумом поглинання рутину зі спиртовим розчином алюмінію хлориду, що обумовлює використання в якості стандартного зразку саме рутину та проведення аналізу при даній довжині хвилі. Використання компенсаційного розчину виключає вплив забарвлених супутніх речовин в області максимального поглинання комплексу суми флавоноїдів зі спиртовим розчином алюмінію хлориду та забезпечує специфічність методики.

Для визначення прийнятності аналітичної методики до вимог сучасної нормативної документації та ДФУ перед вивченням валідаційних характеристик розраховували *критерії прийнятності валідаційних характеристик* спектрофотометричної методики кількісного визначення суми флавоноїдів у краплях складних, враховуючи допуски вмісту діючих речовин ± 10 %.

Таблиця 1

КРИТЕРІЇ ПРИЙНЯТНОСТІ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Критерії прийнятності	Величини критичних значень, %
<i>Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин, в 1 г препарату, має бути не меншим 1,5 мг</i>	
<i>Допуски за АНД</i>	± 10
<i>Максимально допустима повна невизначеність методики - $\Delta A_s \text{ max}$</i>	3,2
<i>Максимальна систематична похибка – $\text{max} \delta$</i>	1,024
<i>Індекс кореляції - R_c</i>	1,0000
<i>Критичне практично незначуще значення вільного члену – a</i>	5,12

У першу чергу нами була визначена стабільність аналітичного розчину у часі. Вимірювання оптичної густини проводили через 40 – 60 хв після додавання реактиву, оскільки відомо, що перші 40 хв після утворення комплекс флавоноїдів з алюмінію (III) хлоридом нестійкий (табл. 2).

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРИГОТОВАНОВОГО РОЗЧИНУ

Час дослідження стабільності, хв					середнє	RSDt, %	$\Delta t, \%$	max $\delta, \%$
40	45	50	55	60				
0,5523	0,5563	0,5566	0,5586	0,5586	0,5565	0,4650	0,9914	1,024

*Значення оптичної густини розчину є середнім з трьох вимірювань.

Результати, наведені у таблиці 2, свідчать, що прийнятна стабільність аналітичного розчину спостерігається протягом 20 хв, через 40 хв після приготування аналітичного розчину. Статистична оцінка впливу часу на аналізований

розчин відповідає критеріям прийнятності, що доводить надійність результатів аналізу при невеликих змінах параметрів методики. Вплив рН не враховували, через стабільність розчину у сильно-кислому середовищі.

Дослідження *лінійності* аналітичної методики проводили в інтервалі 70-130 % на п'яти модельних розчинах з урахуванням рівномірного розкиду концентрацій протягом всього етапу (70 %, 85 %, 100 %, 115 %, 130 %), що дорівнює 0,7 мл, 0,85 мл, 1 мл, 1,15 мл, 1,30 мл розчину А відповідно (1 мл розчину А прийняли за 100 %). Дослідження проводили за схемою згідно вимогам ДФУ [1, 2, 4]. Вимірювання оптичної густини проводили з рандомізацією кювети (кожної 3 рази). Дослідження

проводили за однакових умов: в один день, на одному приладі, одним і тим самим аналітиком. Нами одночасно були вивчені лінійність, правильність і збіжність.

Для оцінки *лінійності, правильності та збіжності* було отримано 15 значень оптичних густин модельних розчинів (оптичну густину кожного розчину вимірювали 3 рази з рандомізацією кювети). Отримали 15 результатів оптичної густини, кожної концентрації по 3 результати.

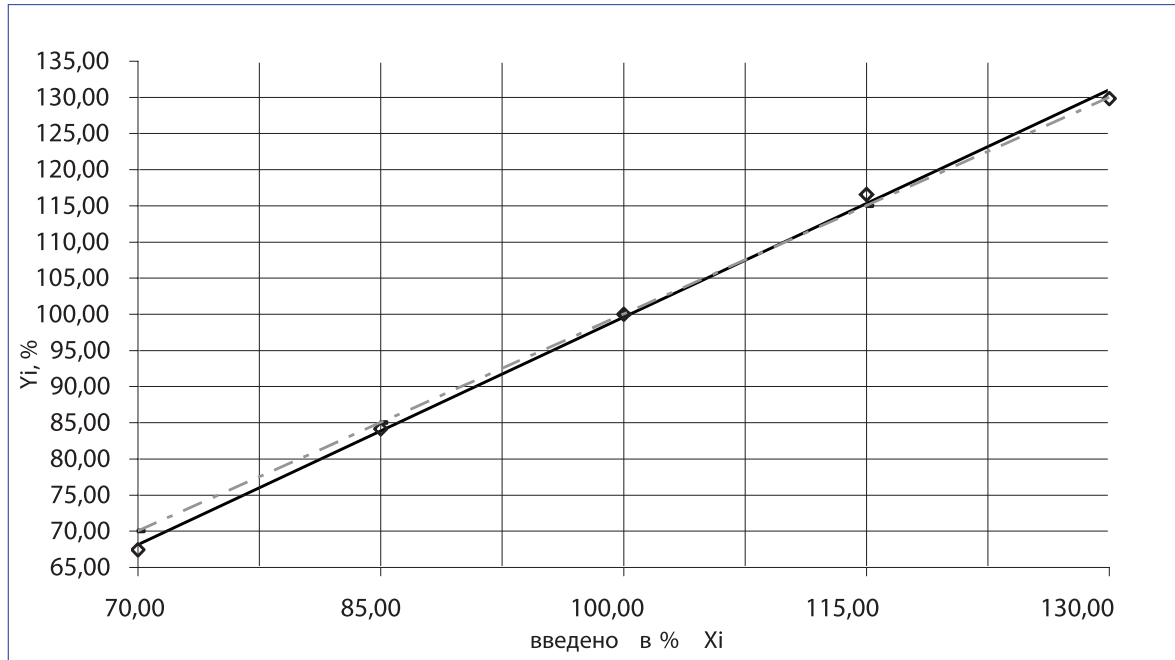


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини від концентрації флавоноїдів у нормалізованих координатах

Вимоги до параметрів лінійної залежності виконуються на всьому діапазоні застосування методики (рис. 1). Результати вивчення лінійності модельних розчинів складних крапель наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ЛІНІЙНОСТІ МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ

№ модельного розчину	Введено, %	Введено розчину В, мл	Знайдено, мг	Знайдено, %	Знайдено сер., %	$Y_i = b x_i + a$
1	70	0,7	1,3245	67,6122	67,43	67,42
			1,3174	67,2497		
			1,321	67,4309		
2	85	0,85	1,6512	84,2887	84,23	84,17
			1,6478	84,1074		
			1,6512	84,2887		
3	100	1	1,9602	100,0588	100	100
			1,9602	100,0588		
			1,9566	99,8775		

4	115	1,15	2,2833	116,554	116,31	116,56
			2,2762	116,1915		
			2,2762	116,1915		
5	130	1,3	2,5425	129,7864	130,03	129,85
			2,5532	130,3302		
			2,5461	129,9677		
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b					1,0040	
Sb					0,0037	
Вільний член лінійної залежності a					-0,4625	
Sa					0,3737	
Залишкове стандартне відхилення So					0,1814	
Коефіцієнт кореляції методики r					1,0000	
Критичне значення залишкового стандартного відхилення, $RSD_0^{1\%}$					24,7816	
Критерій лінійного коефіцієнту кореляції R_c					0,9981	

Одержані результати свідчать про виконання вимог до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується на всьому діапазоні концентрацій (70 – 130 %). Працювали в нормалізованих координатах, визначали кон-

центрації та аналітичний сигнал у відсотках до номінальних значень. Розраховували величину $Z=100 \cdot (Y_i/X_i)$, яка характеризує «знайдену» концентрацію до «введеної» у відсотках (табл. 4).

Таблиця 4

ВАЛІДАЦІЙНІ ПАРАМЕТРИ: ПРАВИЛЬНІСТЬ ТА ЗБІЖНІСТЬ АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ

Об'єм аликвоти, мл	Введено у % до концентрації 100% ($X_{\text{факт}}\%$)	Оптичні густини A_i	Знайдено у % до концентрації 100% розчину ($Y_i\%$)	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
0,7	70	0,373	67,6122	96,59
	70	0,371	67,2497	96,07
	70	0,372	67,4309	96,33
0,85	85	0,465	84,2887	99,16
	85	0,464	84,1074	98,95
	85	0,465	84,2887	99,16
1	100	0,552	100,059	100,06
	100	0,552	100,059	100,06
	100	0,551	99,8775	99,88
1,15	115	0,643	116,554	101,35
	115	0,641	116,192	101,04
	115	0,641	116,192	101,04
1,3	130	0,716	129,786	99,84
	130	0,719	130,33	100,25
	130	0,717	129,968	99,98
Середнє Z%				99,32
відносне стандартне відхилення, Sz%				1,693
відносний довірчий інтервал $\Delta as\% = t(95\%, 14) \cdot Sz$				2,9819
критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\%$				3,2
систематична погрішність δ				-0,68
критерій невизначеності систематичної погрішності				1,024
загальний висновок про методику				коректна

Методика є коректною, оскільки для ΔZ , розрахованої за відношенням, виконуються вимоги: $\Delta Z\% \leq \max \Delta As = 3,2\%$. Методика не має

значущої систематичної похибки. Отримані результати свідчать про те, що спектрофотометрична методика відповідає сучасним критеріям

до аналітичних методик кількісного визначення за такими параметрами, як точність, збіжність та лінійність.

Для дослідження внутрішньолaborаторної прецизійності методики МПП були проведені вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні

дні, різними аналітиками. Отримані результати є порівнянням статистичних відхилень двох різних вимірювань і свідчать, що дана методика може бути відтворена з довірчою вірогідністю 95% відхилення одиничного значення $100 \pm 0,55\%$. Величина $\Delta \text{intra}\% = 0,5504 \leq 3,2$ (табл. 5).

Таблиця 5

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ТОЧНОСТІ МЕТОДИКИ

№ випробуваного розчину	Величини Zi	
	№ 1	№ 2
1	96,59	97,88
2	96,07	97,88
3	96,33	97,58
4	99,16	100,02
5	98,95	100,02
6	99,16	100,1
7	100,06	100,0
8	100,06	99,99
9	99,88	100,5
10	101,35	100,42
11	101,04	101,34
12	101,04	102,24
13	99,84	101,64
14	100,25	101,8
15	99,98	101,7
середнє	99,32	100,21
об'єднанне середнє Zintra%	99,7623	
відносний довірчий інтервал $\Delta \text{intra}\%$	0,5504	
міжlaborаторна систематична похибка	-0,23767	
S intra%	1,6937	1,4704
SD intra%	1,58207	

У ході досліджень було встановлено, що методика прецизійна, основана на специфічній реакції комплексоутворення з розчином алюмінію хлориду для флавоноїдів, доступна, займає мінімум робочого часу, не потребує дорогих реактивів. Дана методика дозволяє об'єктивно визначати вміст флавоноїдів у лікарському препараті.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

Проведено валідацію методики кількісного визначення флавоноїдів у складних краплях для урології спектрофотометричним методом за методом показника поглинання.

Визначені параметри: робастності, лінійності, правильності, прецизійності (збіжність, внутрішньолaborаторна прецизійність) на всьому діапазоні застосування методики. Дана методика може бути коректно відтворена в умовах лабораторії.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Вишнеvsька Л.І. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів методом УФ-спектрофотометрії у настойці складній «Бронхофіт» /Л.І. Вишнеvsька, О.А. Євтіфеєва, С.В. Гарна, В.К. Яковенко, К.О. Хохлова // Український медичний альманах. – 2010, Т.13. – № 1. – С. 33-35.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, – 2004. – 494 с.; Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ. – 2008. – 608 с.
3. Евдокимова О.В. Валідація методики кількісного визначення сумми флавоноїдів в столбиках с рыльцами кукурузы / О.В. Евдокимова // Фармація. – 2008. – № 7. – С. 14-17.

4. Евтифеева О.А. Стандартная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О.А. Евтифеева, В.А. Георгиянц // Фармаком. – 2006. – №1. – С. 69-81.
5. British Pharmacopoeia. – London: HMSO, 2001. – Vol. 1. – 1359 p.
6. Chandran S. Comparison of various international guidelines for analytical method validation / S. Chandran, R. Singh // Pharmazie. — 2007. — Vol. 62, Issue 1. – P. 4-14.
7. European Pharmacopoeia. – 6 th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – 3261 p.
8. Khokhlova K., Vishnevskaya L., Yakovenko V., Vishnevskaya M. Development and validation of the quantitative determination method of flavonoids in the preparations // Conference: 42nd IUPAC Congress; SYMPOSIUM: Quality Assurance of Medicines and Detection of Counterfeits, Glasgow, 2-7 August 2009. – P107_018.
9. Pueyo I.U. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content / I.U. Pueyo, M.I. Calvo // Fitoterapia. – 2009. – Vol.80, Issue 8. – P. 465-467.

УДК: 615.451: 615.07: 543.42.062

Вишневская Л.И., Вишневская М.С., Хохлова Е.А.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ОРАЛЬНЫХ КАПЛЯХ УРОХОЛ

Проведена валидация методики количественного определения флавоноидов в оральных каплях для урологии методом спектрофотометрии. В ходе проведения исследования были определены основные валидационные параметры: робастность, линейность, правильность и прецизионность на всем диапазоне применения методики. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данная методика отвечает современным критериям, предъявляемым к методикам количественного определения и позволяет объективно опеределить содержание суммы флавоноидов в лекарственном препарате.

Ключевые слова: валидация, лекарственное растительное сырье, флавоноиды, спектрофотометрия, рутин

UDK: 615.451: 615.07: 543.42.062

Vishnevskaya L.I., Vishnevskaya M.S., Khokhlova K.O.

VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN ORAL DROPS UROCHOL

The validation of method of quantitative determination of flavonoids in oral drops for urology by method of absorption spectrophotometry was conducted. As a result of work the basic validation parameters were determined, such as: robustness, linearity, trueness, precision at the all range of method's use. The findings indicates that this method fit with modern criteria for methods of quantitative determination and allows to determine objectively the sum of flavonoids in drug.

Key words: validation, herbal medicine, flavonoids, absorption spectrophotometry, rutin

Адреса для листування:
м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
ІПКСФ НФаУ
E-mail: Katushka2106@mail.ru

Надійшла до редакції: 17.05.2010