

Валідація методики кількісного визначення флавоноїдів у комплексному фітопрепараті седативної дії

С.В.Гарна, А.Ю.Бочкарьова, В.А.Георгіянц

Національний фармацевтичний університет, кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків
Харків, Україна

Уперше проведено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення суми флавоноїдів у препараті «Седавіт». Валідація була здійснена відповідно до вимог Державної Фармакопеї України. Вивчення валідаційних характеристик методики, статистична обробка отриманих результатів дослідження дозволяють визначити придатність методики для подальшого використання.

Ключові слова: валідація, кількісний аналіз, флавоноїди.

ВСТУП

У теперішній час відмічається тенденція росту рівня психопатологічних розладів, чому сприяють різні соціальні та психологічні фактори: хронічна втома, стреси, екологічні проблеми, інформаційна насиченість, погіршення якості життя. Вищезазначене потенціює споживання седативних лікарських засобів. Одним із таких засобів є розчин для пиття «Седавіт» — заспокійливий засіб з вітамінами, який позитивно впливає на функціонування нервової системи, усуває напруження, психічні виснаження [1]. Розчин «Седавіт» створений на основі комплексного екстракту лікарської рослинної сировини (ЛРС) — коренів з кореневищами валеріани лікарської, плодів глоду, листя м'яти перцевої, трави звіробою звичайного та шишок хмелю. Такий склад дозволив забезпечити, за даними фармакологічних досліджень, виражену седативну та анксиолітичну дію [2]. Як відомо, фармакологічну активність лікарських препаратів рослинного походження забезпечують

біологічно активні речовини ЛРС. Запропонована технологія отримання сумарного екстракту забезпечує наявність у ньому різних груп біологічно активних речовин (БАР), однією з яких є флавоноїди, що містяться в різних кількостях у всіх використовуваних видах ЛРС. Відомою є антиоксидантна активність флавоноїдів, що є дуже цінним для комплексної фармакологічної дії лікарського засобу. Зважаючи на це, визначення кількісного вмісту флавоноїдів у розчині для пиття «Седавіт» є одним із необхідних показників якості [3].

Загальноприйнятим методом кількісного визначення флавоноїдів є метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ-спектрі та видимій області, заснований на взаємодії з розчином алюмінію хлориду, який викликає на спектрі батохромний зсув в область 410-420 нм [4-7]. Така поведінка характерна для флаванонів та дигідрофлавонолів. Вітаміни, що входять до складу лікарської форми, — піридоксину гідрохлорид та нікотинамід — являють собою ароматичні сполуки і можуть завдати вплив на результати спектрофотометричного аналізу. Відповідно до вимог ДФУ [8] всі методики, запропоновані для лікарських засобів, мають бути валідованими.

Метою дослідження було проведення валідації спектрофотометричної методики кількісного визначення суми флавоноїдів у препараті «Седавіт».

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилися з використанням аналітичного обладнання: ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, спектрофотометр «SPECORD 200». Визначення проводили за методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-спектрі та видимій області (2.2.25) [8].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [9].

У роботі використані реактиви, приготовлені відповідно до монографій ДФУ: 3% розчин алюмінію хлориду в 96% спирті етиловому, етилацетат, 70% спирт етиловий, а також мірний посуд класу А, який відповідає ДСТУ 29228-91 [10].

Методика кількісного визначення суми флавоноїдів:

– випробуваний та модельні розчини для визначення суми флавоноїдів готували, використовуючи рівномірний розкид концентрації флавоноїдів від номінальної на всьому діапазоні застосування методики від 80% до 120% за такою методикою: 10,00 мл препарату поміщають у стакан місткістю 50,00 мл, нагрівають на киплячій водяній бані до видалення запаху спирту. Охолоджують до кімнатної температури, додають 10,00 мл води та переносять до ділильної лійки місткістю 100,00 мл, додають 40,00 мл етилацетату та енергійно струшують протягом 3 хв. Після розділення шарів водний (нижній) зливають, а (верхній) етилацетатний шар фільтрують через паперовий фільтр «біла стрічка» у мірну колбу місткістю 50,00 мл. Фільтр промивають 10,00 мл етилацетату, доводять об'єм розчину етилацетатом до мітки і перемішують. 5,00 мл отриманого розчину поміщають у стакан місткістю 50,00 мл, упарюють досуха на киплячій водяній бані. Сухий залишок розчиняють у 15,00 мл 70% спирту етилового та переносять у мірні колби 1 та 2 місткістю по 25,00 мл кожна. До 1 колби додають 5,00 мл 3% розчину алюмінію хлориду в 96% спирті етиловому, доводять об'єм розчину 70% спиртом етиловим до мітки і перемішують. Через 30 хв. вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 416 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи в якості розчину порівняння розчин 2, доведений до мітки 70% спиртом етиловим і перемішаний. Вимірювання проводять при температурі $20 \pm 1^\circ\text{C}$ за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

– розчин плацебо: 5,00 мл 3% розчину алюмінію хлориду в 96% спирті етиловому поміщають у мірну колбу 25,00 мл, доводять об'єм розчину 70% спиртом етиловим до мітки і перемішують.

Вміст суми флавоноїдів (ϕ) у 1,00 мл препараті, у перерахунку на рутин в г, обчислюють за формулою [1]: $X_i = (D * 50 * 25) / (215 * 10 * 5 * 100) = D / (215 * 4)$ (1), де D – оптична

густина випробуваного розчину; 215 – питоми показник поглинання комплексу рутину з алюмінію хлоридом в 70% спирті етиловому при довжині хвилі 412 нм.

За теоретичними розрахунками вміст флавоноїдів становить 0,3 мг в 1,00 мл препарату.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За зазначених умов нами був отриманий спектр поглинання розчину «Севавіт» (рис. 1), що має наявний максимум при довжині хвилі 416 нм.

При проведенні кількісного визначення суми флавоноїдів методом спектрофотометрії нами було обрано діапазон застосування методики від 80% до 120% від номінального вмісту флавоноїдів в 1,00 мл препарату (0,0003 г) за вимогами ДФУ [8] (допуски вмісту становлять $\pm 10\%$).

Спочатку було проведено теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу й отримано наступні результати: максимальна допустима повна невизначеність методики – 3,20; максимальна систематична помилка – 1,02; критичне значення – 1,81; індекс кореляції – 0,9924; критичне значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – 5,12.

Метрологічні характеристики випробуваної спектрофотометричної методики не повинні перевищувати величини критичних значень розрахованих критеріїв прийнятності для аналітичної методики.

ДФУ регламентує визначення таких валідаційних характеристик для методик кількісного визначення: правильність, збіжність, специфічність, лінійність, відтворюваність, робастність [8].

Специфічність підтверджується результатами вивчення впливу плацебо. Вимірюван-

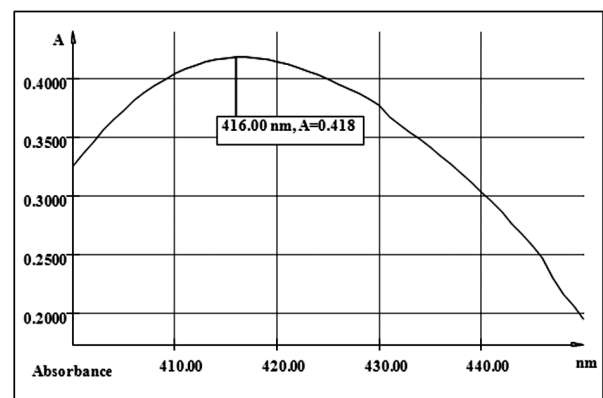


Рис. 1. Спектр поглинання розчину «Севавіт».

ТАБЛИЦЯ 1

Результати дослідження методики спектрофотометричного визначення

Валідаційні характеристики	Допуски відповідно до ДФУ ($\pm 10\%$)	
	отримані та критичні значення, %	
	Лаб. №1	
стабільність у часі $\Delta_t \leq \max \delta$, %	$0,35 \leq 1,02$	стабільність у часі $\Delta_t \leq \max \delta$, %
стабільність до змін $\Delta_{pH} \leq \max \delta$, %	$0,45 \leq 1,02$	стабільність до змін $\Delta_{pH} \leq \max \delta$, %
збіжність $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As}$, %	$2,27 \leq 3,20$	збіжність $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As}$, %
правильність $\delta \leq \max \delta$, %	$0,20 \leq 1,02$	правильність $\delta \leq \max \delta$, %
лінійність	$R_{rest} \leq RSD_{07}$, %	лінійність
	$a \leq \max a$, %	
	$r \geq R_c$	
відтворюваність, $\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As}$, %	$0,62 \leq 3,20$	$R_{rest} \leq RSD_{07}$, %
		$a \leq \max a$, %
		$r \geq R_c$

ня оптичної густини випробуваного розчину A_{blank} та розчину плацебо виконували три рази з вийманням кювети за довжини хвилі 416 нм. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння A_{st} . Розрахунки проводили за формулою:

$$\delta_{exc} = \frac{100 \times A_{blank}}{A_t}$$

Для оцінки впливу повинна виконуватися нерівність:

$$\delta_{exc} \leq 0,3 \times \max \delta = 0,3 \times 0,3 \times \max \Delta_{st} = 0,033 \times B,$$

де $B = \pm 10\%$ тобто $\delta_{exc} \leq 0,33\%$.

Дослідження показали, що вплив плацебо для випробуваного розчину ($A_t = 0,418$, $A_{blank} = 0,0005$) становить $\delta_{exc} = 0,12\%$. Отримане значення δ_{exc} для досліджуваного розчину не перевищує критичне $0,12\% \leq 0,33\%$, фонове поглинання є незначущим, і методика характеризується припустимою специфічністю. Наявні в розчині вітаміни не завдають впливу на оптичне поглинання при довжині хвилі 416 нм.

Вивчення характеру *лінійної залежності* оптичної густини від концентрації проводили, використовуючи 15 модельних розчинів для аналізу. Отримані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y = b \times x + a$. Розраховані статистичні величини b, S_b, a, S_a, S_r (остаточне стандартне відхилення) та r (коефіцієнт кореляції). На основі отриманих даних побудували калібрувальний графік у нормалізованих координатах. Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконуються на всьому діапазоні застосування методики (80-120%).

Для оцінки *робастності* Δ_{pH} проводили дослідження впливу рН середовища на стабільність оптичного поглинання модельних розчинів з концентраціями (90%, 100%, 110%), при цьому відтворювали коливання $pH \pm 10\%$. Для отриманих модельних розчинів вимірюва-

ли оптичну густину при обраній довжині хвилі. Як видно з отриманих результатів (табл. 1), незначні коливання рН не завдають впливу на результати аналізу.

Перевірку *стабільності в часі* Δ_t аналітичного розчину проводили впродовж години (через кожні 10 хв.). Встановлено, що впродовж зазначеного часу оптичне поглинання розчину є стабільним, що підтверджується відповідністю отриманих результатів критеріям прийнятності (табл. 1).

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки *збіжності і правильності* методики було отримано три значення оптичних густин для розчину порівняння та 15 значень оптичних густин модельних розчинів. При валідації збіжності відповідає значення відносного довірчого інтервалу $\Delta_{as}, \%$; правильність характеризується величиною систематичної похибки аналізу $\delta, \%$. Експериментальними дослідженнями (табл. 1) встановлено, що зазначені величини відповідають вимогам ДФУ.

Щоб дослідити *відтворюваність* методики в умовах іншої лабораторії, були проведені вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях, різними аналітиками. Отримані результати підтвердили коректність методики при її відтворенні в умовах різних лабораторій (табл. 1).

Таким чином, сумарна оцінка отриманих валідаційних характеристик цієї методики дозволяє рекомендувати її для проведення кількісного визначення суми флавоноїдів у препараті «Седавіт».

ВИСНОВКИ

1. Здійснено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення суми

флавоноїдів у препараті «Седавіт» за валідаційними характеристиками: специфічність, робастність, лінійність, правильність, збіжність та відтворюваність. Отримані метрологічні характеристики методики не перевищують критерії прийнятності відповідно до ДФУ.

2. Виходячи з отриманих результатів, методика може бути використана для кількісного аналізу суми флавоноїдів у випробуваному препараті.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зейгорник М. Седативные препараты растительного происхождения доступны и безопасны / М.Зейгорник // Ремедиум. — 2000. — №9. — С. 85-86.
2. Мачерет Є.Л. Седавіт – новий оригінальний заспокійливий засіб / Є.Л.Мачерет, Г.М.Чуприна // Новости медицины и фармации. — №11 (139). — 2003. — С. 9.
3. Обґрунтування складу лікарського засобу седативної дії / С.В.Гарна, А.І.Русинов, В.А.Георгіянци, Н.Ф.Маслова, С.В.Лукашов // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики. — 2010. — Вип.23. — №2. — С. 13-16.
4. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів методом УФ-спектрофотометрії у настійці складній «Бронхофіт» / Л.І.Вишневецька, О.А.Євтіфєєва, С.В.Гарна, В.К.Яковенко, К.О.Хохлова // Укр. мед. альманах. — 2010. — Т.13. — №1. — С. 33-35.
5. LC and UV determination of flavonoids from Passiflora alata medicinal extracts and leaves / S.D.Müller, S.B.Vasconcelos, M.Coelho, M.W.Biavatti // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2005. — Vol. 37. — №2. — P. 399-403.
6. Aluminum ion complex formation with 3-hydroxyflavone in Langmuir and Langmuir-Blodgett films / J.P.Santos, M.E.D.Zaniquelli, W.F.De Giovanni, S.E.Galembeck // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2002. — Vol. 198-200. — №2. — P. 569-576.
7. De Souza R.F.V. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids / R.F.V.De Souza, W.F.De Giovanni // Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. — 2005. — Vol. 61. — №9. — P. 1985-1990.
8. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
9. Державна Фармакопея України / Держ. П-во «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид., доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — 520 с.
10. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания: ГОСТ 29228-91. — М.: Изд-во стандартов, 1992. — 9 с.

С.В.Гарна, А.Ю.Бочкарева, В.А.Георгіянци.
Валідація методики кількісного визначення флавоноїдів в комплексному фітопрепараті седативного действия. Харків, Україна.

Ключевые слова: валідація, кількісний аналіз, флавоноїди.

Вперше проведена валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення сумми флавоноїдів в препараті «Седавіт». Валідація була здійснена згідно з вимогами Госу­дарственной Фармакопеї України. Изучение валідаційних характеристик методики, статистическая обработка полученных результатов исследования позволяют определить пригодность методики для дальнейшего использования.

S.V.Garna, A.Yu.Bochkarova, V.A.Georgiyants.
Validation of method of quantitative determination of flavonoids in complex preparation with sedative action. Kharkiv, Ukraine.

Key words: validation, quantitative determination, flavonoids.

Validation of the spectrophotometric method of quantitative determination of the sum of flavonoids in preparation «Sedavit» has been carried out for the first time. Validation was carried out according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. The study of validation characteristics of the method, statistic estimation of results of research, allow defining the possibility for its further use.

Надійшла до редакції 11.12.2010 р.