

УДК 615.322:615.074

В. Л. ШЕВІНА<sup>1</sup>, Н. В. ХОХЛЕНКОВА<sup>2</sup>, О. С. РЕМЕЗ<sup>1</sup><sup>1</sup>ПАТ «Фармак», м. Київ<sup>2</sup>Національний фармацевтичний університет, м. Харків

## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ У ПРЕПАРТІ ТАБЛЕТКАХ «УРОНЕФРОН»

*Проведено валідацію спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у таблетках «Уронефрон». Визначено валідаційні характеристики та експериментально підтверджено їх відповідність необхідним критеріям прийнятності. Отримані результати свідчать про те, що розроблена 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, кількісне визначення, флавоноїди, абсорбційна спектрофотометрія, рутин.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

На теперішній час фармацевтичний ринок України характеризується збільшенням кількості рослинних лікарських препаратів та розширенням асортименту лікарських форм вже існуючих лікарських засобів рослинного походження. Проблема стандартизації лікарської рослинної сировини та фітопрепаратів залишається актуальною і є першочерговою задачею фармацевтичного аналізу, щодо контролю якості та вибору критеріїв доброякісності лікарських засобів рослинного походження.

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Сечокам'яна хвороба (СКХ) – поширене захворювання, пов'язане з утворенням сечових каменів у нирках і сечовивідних шляхах (сечовому міхурі і сечоводі). Захворювання вражає людей різного віку, але частіше 20-50 років. СКХ становить 30-45 % всіх урологічних недуг.

Незважаючи на успіхи, досягнуті в останні роки при наданні допомоги хворим з СКХ, питання діагностики, лікування та профілактики уролітіазу продовжують залишатися актуальними до теперішнього часу [6]. Захворюваність СКХ у світі становить не менше 3% і продовжує прогресивно зростати [1].

З метою впровадження нових високоефективних технологій лікування СКХ на ПАТ «Фармак» був розроблений препарат – таблетки «Уронефрон». Розроблений препарат являє собою тверду лікарську форму на основі сухого екстракту з 9 рослин. Сухий екстракт з 9 рослин представляє собою суміш лушпиння цибулі ріпчастої, кореня пирію, листя берези, насіння пажитника, кореня петрушки, трави золотарника, трави хвоща польового, трави пташиного горця, кореня любистку.

Багатокомпонентність складу розроблених таблеток «Уронефрон» обумовлює пошук оптимального способу аналізу і стандартизації діючих речовин – флавоноїдів [5]. У практиці стандартизації лікарської рослинної сировини і препаратів рослинного походження широко використовується спектрофотометричний метод оцінки сумарного вмісту біологічно активних речовин, який є достатньо точним, не вимагає багато часу, дає можливість економно витратити реактиви і досліджувани речовини.

### ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Здатність фенольних сполук поглинати в УФ-області зумовлює використання цього методу для стандартизації лікарської рослинної сировини та препаратів на її основі. У результаті проведеної попередньої роботи, нами була розроб-

© Колектив авторів, 2015

лена методика кількісного визначення діючих речовин (суми флавоноїдів) в таблетках «Уронефрон», з використанням методу абсорбційної спектрофотометрії.

#### ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою роботи було проведення валідації методики кількісного визначення флавоноїдів у таблетках «Уронефрон». За допомогою експериментальних досліджень довести, що методика дозволяє достовірно контролювати кількісний вміст суми флавоноїдів в розробленому препараті.

#### ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

У якості фотометричної реакції використали відому реакцію утворення комплексних сполук поліфенолів з алюміній хлоридом [3]. Було досліджено, що в електронних спектрах поглинання, спостерігається чіткий максимум поглинання розчину порівняння та випробувального розчину при довжині хвилі  $412 \pm 2$  нм з гарними аналітичними характеристиками щодо специфічності та чутливості. Це дозволяє використовувати метод абсорбційної спектрофотометрії для кількісного визначення флавоноїдів в розробленому препараті. Електронні спектри поглинання досліджуваних розчинів і стандартного розчину рутину співпадають за положенням максимуму поглинання і за ходом кривих світлопоглинання. Це дозволило обрати рутин як стандарт для розрахунку вмісту флавоноїдів.

**Методика кількісного вмісту суми флавоноїдів.**

Визначення проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області (ДФУ, 2.2.25). Випробовуваний розчин готували наступним чином: 0,400 г розтертих таблеток поміщали у конічну колбу місткістю 25 мл, додавали 20 мл 70 % спирту, нагрівали до 60 °С, перемішували на водяній бані за температури 60 °С до утворення однорідної суміші, відстоювали протягом 5 хв і фільтрували отриману суміш крізь паперовий фільтр. Фільтрат переносили в мірну колбу місткістю 50 мл, після чого доводили об'єм отриманого розчину тим самим розчинником до позначки і перемішували (розчин А).

У мірну колбу місткістю 25 мл поміщали 10,0 мл розчину А, додавали 10 мл 70 % спирту, 3,0 мл розчину 30 г/л алюмінію хлориду Р в 96 % спирті Р, доводили об'єм розчину 70 % спиртом до позначки, перемішували (випробовуваний розчин).

Контрольний розчин готували наступним чином: 10,0 мл розчину А поміщали в мірну колбу на 25 мл доводили 70 % спиртом до позначки, перемішували.

Через 30 хв вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 412 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи контрольний розчин як компенсаційний.

Вміст суми флавоноїдів (Х) в препараті, в перерахунку на рутин, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 50 \times 25}{230 \times m \times 10} = \frac{A \times 125}{230 \times m},$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину; m – маса наважки препарату, в грамах; 230 – питомий показник поглинання комплексу рутину з хлоридом алюмінію Р в 96 % спирті за довжини хвилі 412 нм.

Вміст суми флавоноїдів в препараті, в перерахунку на рутин, має бути не менше 0,8 %.

Об'єктом дослідження був обраний розроблений препарат – таблетки «Уронефрон». Засобами вимірювальної техніки при розробки та валідації методики були: спектрофотометр Шимадзу UV2401PC з програмним забезпеченням UVprobe, ваги Sartorius ED 412S та мірний посуд класу А. Реактиви: алюмінію хлорид, спирт етиловий Р, вода очищена Р.

Під час розробки проекту Методик контролю якості (МКЯ) на таблетки «Уронефрон» відповідно до вимог ДФУ з використанням рекомендацій [2, 4] було проведено валідаційні випробування.

Придатність методики оцінювали за наступними параметрами: специфічність, лінійність в заданому діапазоні (50-120 %), точність і правильність.

Для підтвердження специфічності було проаналізовано розчин плацебо, як компенсаційний розчину було використано 70 % спирт. Величина абсорбції складала 0,002, що становить 0,4% від величини абсорбції розчину з концентрацією діючої речовини 100 % від регламентної норми. Отже, специфічність методики було доведено.

Випробувані розчини було проаналізовано за допомогою запропонованої аналітичної методики. За допомогою програмного забезпечення «Validation» виконано регресійний аналіз отриманих даних на дотримання умов лінійності, правильності, точності, межі виявлення та межі кількісного визначення.

З розрахованих програмним забезпеченням значень стандартного відхилення, максимально припустимого RSD (максимально припустиме RSDp-9.93; розраховане об'єднане стандартне відхилення RSDp — 0,08) та критерію Ст'юдента (Student (95, 1, 5) = 2,015) можна зробити висновок, що вимоги до збіжності вимірів витримуються.

У таблиці 1 представлені дані з розрахунку для лінійності та їх критерії розробленої методики.

Отриманий критерій Стюдента  $(95, 1, 2) = 2.92$  свідчить, що вимоги до лінійності витримуються.

У таблиці 2 представлені розрахунки при визначенні точності та правильності розробленої методики.

$$S_{d_r} (\%) = 2,2034 \text{ Student } (95, 1, 3) = 2,3534$$

Отримані данні свідчать, що вимоги до точності витримуються та вимоги до правильності витримуються по першому критерію.

### ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проведено валідацію методики кількісного визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин у таблетках «Уронефрон» методом абсорбційної спектрофотометрії за методом стандарту. Вивчені наступні валідаційні характеристики методики: лінійність, специфічність, правильність в діапазоні концентрацій діючої речовини 50-120%.

Показано, що розроблена методика придатна для кількісного визначення суми флавоноїдів. Методика вважається валідованою та може бути використана для кількісного визначення флаво-

ноїдів у препараті – таблетки «Уронефрон» методом абсорбційної спектрофотометрії.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Мочекаменная болезнь: современные методы диагностики и лечения : руководство / Ю. Г. Аляев [и др.]; под ред. Аляева. М., ГЭОТАР – Медиа – 2010. – 216 с.
2. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Багиров В.Л., Гризодуб А.И., Чибилев Т.Х. и др., - М. – 2007. – 48 с.
3. Беликов В. В., Шрайбер М. С. Методы анализа флавоноидных соединений, Фармация, 1970. — Т. 19, № 1, – С. 66 –72.
4. Йоахим Эрмер Валідация методик в фармацевтическом анализе / Йоахим Эрмер, Джон Х. МакБ. Миллер, – М. – 2013. – 495 с.
5. Державна фармакопея України Допов. 2 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ – 2007. – 617 с.
6. Шевіна В.Л. Аналіз фармацевтичного ринку лікарських засобів, для лікування захворювань сечокам'яної хвороби / В. Л. Шевіна, Н. В. Хохленкова, Т. Г. Ярних // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики – 2014. – №3 (16) – С. 88 – 91

Таблиця 1

### РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

Параметр	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	0.9568			
Sb	0.0354			
Вільний член лінійної залежності a	3.0771	<=   8.4374	<=   16.6192	витримуються за першим критерієм
Sa	2.8895			
Залишкове стандартне відхилення $RSD_0$	1.8417			
$RSD_0 / b$	1.9248	<=   6.8493		витримуються
$RSD_y$	38.8237			
Коефіцієнт кореляції методики r	0.9988	>   0.9843		витримуються

Таблиця 2

### РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ТОЧНОСТІ ТА ПРАВИЛЬНОСТІ

	Параметри	Значення	Вимога 1	Вимога 2	Висновок
Точність	$\Delta_d$	5,1856	<=20		Витримуються
Правильність	$d_{cp} -100$	0,5799	<=2,5928	<= 6,32	Витримуються по 1 критерію

**УДК 615.322: 615.074**

**В. Л. Шевина, Н. В. Хохленкова, О. С. Ремез**

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ПРЕПАРАТА ТАБЛЕТКАХ «УРОНЕФРОН».**

Проведена валидация спектрофотометрической методики определения флавоноидов в таблетках «Уронефрон». Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика соответствует современным критериям к аналитическим методикам количественного определения и позволяет объективно определить содержание суммы флавоноидов в разработанном лекарственном препарате.

**Ключевые слова:** валидация, лекарственное растение сырье, количественное определение, флавоноиды, абсорбционная спектрофотометрия, рутин.

**УДК 615.322: 615.074**

**V. L. Shevina, N. V. Khokhlenkova, O. S. Remez**

**METHOD VALIDATION FOR ASSAY OF FLAVONOIDS IN «URONEPHRON» TABLETS**

Validation of spectrophotometric assay method for total flavonoid content in Uronephron tablets was performed. The validation characteristics were identified and their compliance with required acceptance criteria was confirmed by experiments. The results obtained show that the developed method conforms to the contemporary criteria for the analytical assay methods and allows the objective determination of the sum of flavonoids in the developed drug product.

**Key words:** validation, herbal raw material, assay, flavonoids, absorption spectrophotometry, rutin.

*Адреса для листування:*

04080, м. Київ, вул. Фрунзе, 63

ПАТ «Фармак»

E-mail: info@farmak.ua

Надійшла до редакції:

25.01.2015 р.