

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КУМАРИНІВ У НАСТОЙЦІ СКЛАДНІЙ “ПРОСТАТОФІТ”

*Визначено основні валідаційні характеристики аналітичної методики кількісного дослідження кумаринів методом УФ-спектрофотометрії у настійці складній “Простатофіт”: лінійність, правильність та збіжність, стабільність, внутрішньолабораторну точність. Запропонована методика характеризується достатньою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості розробленого лікарського засобу.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** настійка складна, валідаційні характеристики, спектрофотометрія, кумарини, біхромат калію.

ВСТУП. Створення національних стандартів якості лікарських засобів на основі об'єктивних методів аналізу є гарантією їх ефективності та безпечності. Установлення відповідності якості лікарських засобів рекомендованим нормам передбачає застосування різних аналітичних методів, при цьому остаточний висновок про їх якість значною мірою залежить від самого методу, який повинен відповідати певним вимогам. Загальні прийняті у світі рекомендації з виробництва ліків у вигляді правил GMP містять вимоги до методів випробувань, які використовують для оцінки відповідності фармацевтичної продукції установленим специфікаціям відносно точності та достовірності [1, 10, 16].

Мета нашої роботи полягала у розробці уніфікованої методики одночасного аналізу лікарських рослин розробленої нами настійки складної “Простатофіт” [2] і отримання доказів її валідності на основі вивчення валідаційних характеристик [2, 5, 7].

У практиці стандартизації лікарської рослинної сировини і препаратів рослинного походження широко використовують спектрофотометричний метод оцінки сумарного вмісту біологічно активних речовин (БАР), який є достатньо точним, не вимагає багато часу, дає можливість економно витратити реактиви і досліджувані речовини, про що свідчить той факт, що цей метод аналізу включено до Міжнародної, Британської, Європейської,

Німецької фармакопей. Як розчини порівняння використовують, як правило, розчини стандартних зразків [11-13, 15, 16].

Багатокомпонентність складу настійки “Простатофіт” зумовлює пошук оптимального способу аналізу і стандартизації його діючих речовин. У результаті попередньої роботи ми визначилися здійснювати кількісний аналіз розробленого препарату за сумою кумаринів [2].

Спектрофотометричний метод в УФ-ділянці спектра застосовують для кількісного визначення похідних кумарину, де беруть до уваги зміну оптичної густини розчинів кумарину за довжини хвилі максимуму поглинання в УФ-ділянці спектра того чи іншого кумарину залежно від його концентрації на основі питомих показників поглинання [9, 12, 14].

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Відповідно до вмісту кумаринів (не менше 0,035 %) у лікарській формі та з урахуванням вимог нормативної документації (в нашому випадку  $\pm 10$  %) ми обрали діапазон застосування методики від 80 до 120 %. Симетричні допуски вмісту згідно з ДФУ становлять  $\pm 10$  % [7, 8].

Кількісне визначення кумаринів у препараті проводили за власним поглинанням. Практично всі похідні кумаринів розчинні в органічних розчинниках: хлороформі, етиловому спирті, етиловому ефірі. Тому на етапі пробопідготовки ми проводили екстракцію хлороформом, при цьому витягали супутні групи речовин, які не заважали подальшому визначенню. Для одержання стабільних резуль-

татів випробовуваний розчин готували у 96 % спирті етиловому. Хлороформні витяги об'єднували, випарювали і залишок розчиняли у 96 % спирті. Як розчин порівняння використовували 96 % спирт етиловий.

Для кількісного визначення вмісту суми похідних кумарину в настійці "Простатофіт" (у відсотках) в перерахунку на кумарин використовували метод спектрофотометрії в УФ-ділянці спектра за довжини хвилі 272 нм. Для розрахунку суми похідних кумарину застосовували питомий показник поглинання кумарину за довжини хвилі 272 нм ( $E_{\text{лит.}}=734$ ).

Спочатку проводили теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимої повної невизначеності методики –  $\Delta A_s=3,2$ , максимальної систематичної похибки –  $\text{max}\delta=1,024$ . Внесок плацебо в сумарну величину фонового поглинання є незначущим і ним можна знехтувати, коли виконується відношення  $\delta_{\text{exc}} \leq 0,5 \%$ , критичне

$$\text{значення } RSD_0 \% = \frac{\max \Delta A_s}{t(95 \%, n-2)} = 1,81 \%$$

критичне значення індексу кореляції –  $R_c=0,9593$ , критичне значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності –  $a=5,12$  [5].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Перед початком експерименту з валідації аналітичної методики запропонований метод було випробовано на стандартній речовині кумарин. Перевірили лінійність стандартного розчину в діапазоні застосування методики від 80 до 120 % з рівномірним розкидом концентрацій (рис. 1).

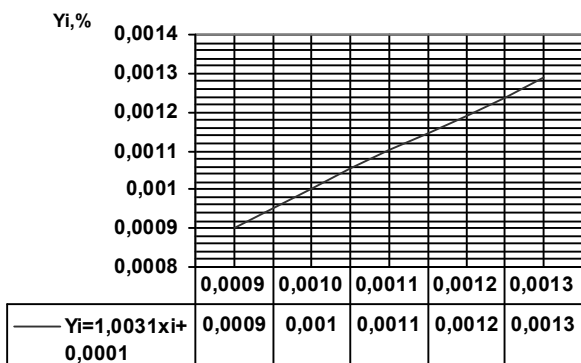


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини від концентрації кумарину в нормалізованих координатах.

Отримані результати обробляли статистично методом найменших квадратів для прямої  $Y=b \cdot x+a$ . Розраховували статистичні величини:  $b=0,9867$ ;  $S_b=0,0324$ ;  $a=0,00001$ ;  $S_a=0,00004$ ;  $S_r=0,00018$  та  $r=0,9930$ . Як видно з рисунка

1, вимоги лінійності виконувались на всьому діапазоні застосування методики.

На основі отриманих результатів ми дійшли висновку, що за допомогою даної методики можна визначати вміст кумаринів у настійці складній "Простатофіт".

Далі за цією методикою ми визначали вміст кумаринів методом спектрофотометрії. Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики методом питомого показника поглинання. Характер залежності оптичної густини від концентрації вивчали, використовуючи 5 модельних розчинів для аналізу з рівномірним розкидом концентрацій на всьому діапазоні застосування методики (80, 90, 100, 110, 120 %). Значення оптичної густини вимірювали для кожної концентрації тричі.

Отримані результати було статистично оброблено методом найменших квадратів згідно з вимогами ДФУ [7]. Калібрувальний графік будували в нормалізованих координатах (рис. 2).

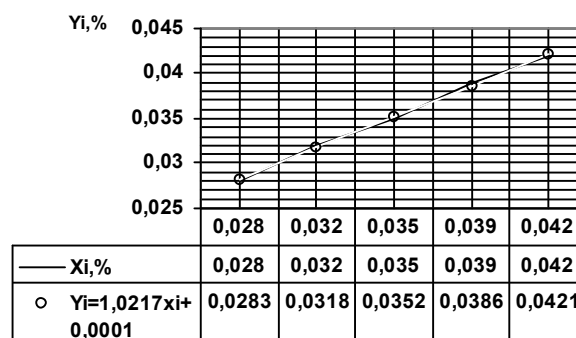


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації кумаринів у нормалізованих координатах.

Для кожного з 5-ти розчинів зразка розраховували середні значення оптичної густини ( $A_i$ ). Одержані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої  $Y=b \cdot x+a$ . Розраховані статистичні величини  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (остаточне стандартне відхилення) та  $r$  (коєфіцієнт кореляції) наведено в таблиці 1.

Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконувались на всьому діапазоні застосування методики (80-120 %).

Перевірку стабільності аналітичного розчину проводили протягом 45 хв. У результаті проведених досліджень ми виявили, що розчин зберігає свою стабільність протягом 30 хв, саме цей час і рекомендуємо для вимірювання оптичної густини.

Статистична оцінка впливу часу на аналізований розчин відповідає критеріям прийнятності.

Результати досліджень наведено в таблиці 2.

Таблиця 1 – Результати вивчення лінійності модельних розчинів та отримані параметри лінійної залежності

№ модельного розчину	Об'єм аликвоти, мл	Введено	Оптичні густини $A_i$	Знайдено	Значення	$Y_i=bx_i+a$
1	8	0,028	0,156	0,0280		0,0283
2			0,156	0,0286		0,0283
3			0,156	0,0284		0,0283
4	9	0,032	0,178	0,0315		0,0318
5			0,177	0,0320		0,0318
6			0,176	0,0320		0,0318
7	10	0,035	0,193	0,0351		0,0352
8			0,195	0,0352		0,0352
9			0,193	0,0351		0,0352
10	11	0,039	0,212	0,0386		0,0386
11			0,214	0,0385		0,0386
12			0,216	0,0384		0,0386
13	12	0,042	0,234	0,0420		0,0421
14			0,232	0,0423		0,0421
15			0,239	0,0423		0,0421
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b					0,9827	
$S_b$					0,0109	
Вільний член лінійної залежності a					0,0008	
$S_a$					0,0004	
Критичне значення для вільного члена лінійної залежності					5,12	
Залишкове стандартне відхилення $S_{rest}$					0,0002	
Критичне значення залишкового стандартного відхилення $RSD_0$					0,0051	
Коефіцієнт кореляції методики r					0,9992	
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції $R_c$					0,9593	

Таблиця 2 – Дослідження стабільності приготованого розчину

Розчин*	Термін дослідження стабільності nt, хв				Середнє	RSD, %	$\Delta$ , %	max $\delta$ , %
	відразу	15	30	45				
$A_i$	0,1933	0,1932	0,1941	0,2009	0,1954	1,899	4,0502	1,024
$A_i$	0,1933	0,1932	0,1941		0,1935	0,341	0,995	1,024

Примітка. \* – значення оптичної густини розчину є середнім трьох вимірювань.

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності й правильності методики нами було одержано 15 значень оптичних густин модельних розчинів за схемою, наведеною в роботі. Розраховували фактичні величини ( $X_i$  факт), відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 15-ти розчинів до показника поглинання  $A_{1cm}^{1\%}$ . Результати розрахунків наведено в таблиці. 3.

Експериментальні результати збіжності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього та, відповідно, низьким стандартним відхиленням  $S_z\%$  ( $S_z\%=1,056 \leq 3,2$ ) на всьому діапазоні концентрацій (80-120 %), що свідчить про якість роботи аналітика та методики, яку застосовували. Систематична

похибка методики МПП становить  $\delta\%=0,05$ , що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення ( $0,05 \leq \max \delta = 1,024$ ).

Щоб дослідити відтворюваність методики МПП в умовах іншої лабораторії, було проведено вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях, різними аналітиками. Отримані результати є результатами порівняння статистичних відхилень двох різних вимірювань і свідчать про те, що дана методика може бути коректно відтворена в іншій лабораторії та характеризується відносним довірчим інтервалом ( $100 \pm 0,448$ ) % з вірогідністю 95 % [3] (табл. 4).

Таблиця 3 – Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

№ модельного розчину	Введено ( $x_i$ , %) ( $X_i$ факт%)	Оптичні густини $A_i$	$y_i$ % ( $Y_i$ %)	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,028	0,156	0,0280	100,00
2	0,028	0,156	0,0286	102,14
3	0,028	0,156	0,0284	101,43
4	0,032	0,178	0,0315	98,44
5	0,032	0,177	0,0320	100,00
6	0,032	0,176	0,0320	100,00
7	0,035	0,193	0,0351	100,29
8	0,035	0,195	0,0352	100,57
9	0,035	0,193	0,0351	100,29
10	0,039	0,212	0,0386	98,97
11	0,039	0,214	0,0385	98,72
12	0,039	0,216	0,0384	98,46
13	0,042	0,234	0,0420	100,00
14	0,042	0,232	0,0423	100,71
15	0,042	0,239	0,0423	100,71
Середнє Z%			100,05	
Відносне стандартне відхилення, Sz%			1,056	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta s$ %			2,26	
Критичне значення для збіжності результатів, $\Delta s$ %			3,2	
Систематична похибка, $\delta$			0,05	
Критерій невизначеності систематичної похибки			0,264	
Загальний висновок про методику			Коректна	

Таблиця 4 – Результати дослідження відтворюваності методики

№ випробовуваного розчину	Величини $Z_i$	
1	100,00	101,23
2	102,14	101,65
3	101,43	102,01
4	98,44	99,65
5	100,00	99,68
6	100,00	99,68
7	100,29	100,3
8	100,57	101,22
9	100,29	100,25
10	98,97	99,56
11	98,72	99,34
12	98,46	101,02
13	100,00	100,31
14	100,71	100,44
15	100,71	100,5
Середнє	100,05	100,456
Об'єднане середнє $Z_{int\ ra}$ %	100,25	
$S_{int\ ra}$ %	1,055	0,817
$SD_{int\ ra}$ %	0,936	
Міжлабораторна систематична похибка $\delta$	0,252	
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{int\ ra}$ %	0,448	

Для роботи використовували аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord-200, ваги – METTLER TOLEDO, рН-метр –

Іономер І-130, реактиви та мірний посуд класу А (першого класу), що відповідають вимогам ДФУ.

Вимірювання здійснювали з використанням кювети завтовшки 1 см при температурі  $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$  за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту” [6, 7].

У процесі валідації було розглянуто такі характеристики, як діапазон застосування, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, відтворюваність [6].

Примітка. При використанні цієї методики, для отримання коректних результатів, проводять контроль оптичної густини спектрофотометрів за біхроматом калію для виключення впливу приладового фактора в разі застосування МПП [4].

**ВИСНОВКИ.** 1. Проведено валідацію методики кількісного визначення кумаринів у настійці складній “Простатофіт” методом спектрофотометрії (метод показника поглинання) за довжини хвилі 272 нм.

2. Вивчено валідаційні характеристики спектрофотометричної методики методом показника поглинання настійки “Простатофіт”: лінійність, правильність та збіжність, стабільність, внутрішньолабораторну точність.

3. У результаті роботи доведено, що вимірювання оптичної густини препарату доцільно проводити протягом 30 хв з моменту приготування розчину (час, протягом якого розчин зберігає стабільність) за власним поглинанням кумарину.

4. Запропонована методика характеризується достатньою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості розробленого лікарського засобу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валідація аналітичних методів // Фармація. – 2006. – № 4. – С. 8-13.
2. Вишневська Л.І. Розробка методик визначення якості настійки складної “Простатофіт” // Журнал органічної і фармацевтичної хімії. – 2008. – 6, вип. 1 (21). – С. 76-80.
3. Гризодуб А.И. Валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42-50.
4. Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 20-34.
5. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валідації методик контролю якості лікарських засобів // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків, РІПЕГ, 2001. – 556 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – Доповнення 1. – Харків: РІПЕГ, 2004. – 520 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків, 2008. – 620 с.
9. Муллажонов М.Т., Бекчанов Х.Н., Назаров Э.А., Комилов Х.М. Количественное определение кумарина в доннике лекарственном методом ВЭЖХ // Farmatsevtika journali. – 2006. – № 1-2. – С. 51-52.
10. Руководство по валідації методик аналізу лікарських засобів. – М., 2007. – 57 с.
11. British Pharmacopoeia. – 2001. – Vol. 11, Appendix III, A 141-A144.
12. By Kracmar J., Kracmarova J., Zyka J. Preview UV-Spektrophotometrie in der Arzneimittelkontrolle. Einfluss der Substitution und der Lösungsmittel auf das UV-spektrophotometrische Verhalten von Stoffen mit Pyridin-Chromophor // Die Pharmazie. – 1968. – 23 (10). – P. 567-573.
13. European Pharmacopoeia. – 5<sup>th</sup> ed. – Electronic version. – 2779 p.
14. Kovacik Jozef, Repcak Miroslav Accumulation of coumarin-related compounds in leaves of Matricaria chamomilla related to sample processing // Food Chemistry. – 2008. – 111. – Issue 3. – P. 755-757.
15. Salgado H.R.N., Oliveira C.L.C.G. Development and validation of an UV spectrophotometric method for determination of gatifloxacin in tablets // Pharmazie. – 2005. – № 4. – P. 263-264.
16. The rules governing medicinal products in the European Union. – Vol. 4. – Good manufacturing practice. – Medicinal products for human and veterinary use. – Guide to good manufacturing practice for medicinal products.

Л.И. Вишневская, А.Г. Чистяков, В.А. Георгиянц, В.К. Яковенко, Е.А. Хохлова  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

## ИССЛЕДОВАНИЯ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КУМАРИНОВ В НАСТОЙКЕ СЛОЖНОЙ “ПРОСТАТОФИТ”

### Резюме

Определены основные валидационные характеристики аналитической методики количественного исследования кумаринов методом УФ-спектрофотометрии в настойке сложной “Простатофит”: линейность, правильность и сходимость, стабильность, внутрилабораторная точность. Предложенная методика характеризуется достаточной чувствительностью, простотой выполнения и может быть использована при контроле качества разработанного лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: настойка сложная, валидационные характеристики, спектрофотометрия, кумарины, бихромат калия.

L.I. Vishnevskaya, O.H. Chistyakov, V.A. Heorhiyants, V.K. Yakovenko, K.O. Khokhlova  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

## RESEARCHES OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF COUMARINS METHOD IN TINCTURE COMPLEX “PROSTATOFIT”

### Summary

We have determined basic validation characteristics for analytical method of coumarins quantitative determination by UF spectrophotometry method in tincture complex “Prostatofit”: linearity, rightness stability, insidelaboratory exactness. The offered method is characterized by sufficient sensitiveness, simplicity of implementation and can be used for quality control of the developed drugs.

KEY WORDS: tincture complex, validation characteristics, spectrophotometry, coumarins, potassium bichromate.

Отримано 28.01.10

Адреса для листування: Л.І. Вишневська, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ