

УДК 615.322:615.451.16:616.2:618.1

ВАЛІДАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У НАСТОЙЦІ СКЛАДНІЙ “ГІНЕКОФІТ”

Л.І.Вишневська

Національний фармацевтичний університет
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: lilya-vishn@rambler.ru

Ключові слова: настойка складна; валідаційні характеристики; гінекологічні захворювання; спектрофотометрія; флавоноїди; розчин гіперозиду

Визначені основні валідаційні характеристики методики кількісного дослідження флавоноїдів методом УФ-спектрофотометрії у настойці складній “Гінекофіт”, в основі якої лежить реакція комплексоутворення з алюмінію хлоридом. Методи характеризуються достатньою чутливістю та простотою виконання.

VALIDATION PARAMETERS OF FLAVONOIDS ASSAY IN COMPOUND TINCTURE “GINEKOFIT”

L.I.Vishnevskaya

Basic validation parameters of the flavonoids assay in the compound tincture “Ginekofit” by UV-spectrophotometry have been determined, in basis of which is the reaction of creation complex with Aluminium chloride. Methods are characterized a sufficient sensitiveness and simplicity of carrying out.

ВАЛИДАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В НАСТОЙКЕ СЛОЖНОЙ “ГИНЕКОФИТ”

Л.И.Вишневская

Определены основные валидационные характеристики методики количественного определения флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в настойке сложной “Гинекофит”, в основе которой лежит реакция комплексообразования с алюминия хлоридом. Методы характеризуются достаточной чувствительностью и простотой выполнения.

За вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ) методики кількісного визначення лікарських засобів, включені до аналітичної нормативної документації, повинні бути валідовані [6, 7, 8].

Процес лабораторного вивчення ступеня придатності аналітичних методів отримав назву “валідація” (validation). З’явилися документи, які регламентують цей процес: загальна фармакопейна стаття в USP [11], ОФС РФ “Валідація фармакопейних методів”, ГОСТ РФ “Точность (правильность и прецизионность методов и результатов измерений)”, ГОСТ Р ИСО 5725-1-1994, документи IUPAC (Міжнародний союз фундаментальної і прикладної хімії), ICSN — міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації ліків для людини у країнах ЄС, Японії, США та ін. [11, 14, 15 17, 19].

Кількісне визначення досліджуваних сполук, тобто флавоноїдів, в УФ- та видимій області спектрів засноване на вимірюванні оптичної густини за довжини хвилі в максимумах поглинання як розчинів аналізованих речовин, так і розчинів їх забарвлених комплексів.

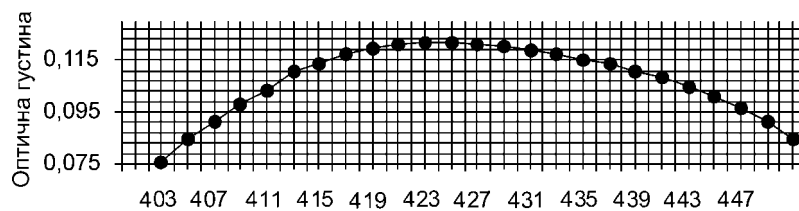
Одна з характерних особливостей флавоноїдних глікозидів — здатність до кислотного та фер-

ментативного гідролізу. Ця характерна здатність флавоноїдних глікозидів до гідролізу використана нами у пробопідготовці в кількісному визначенні вмісту суми флавоноїдів у настойці “Гінекофіт”.

Для кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів у настойці у відсотках у перерахунку на гіперозид використовують метод УФ-спектрофотометрії у видимій області спектра за довжини хвилі 425 нм. Для розрахунку суми флавоноїдів використовується питомий показник поглинання комплексу гіперозиду з алюмінію хлоридом реактивом за довжини хвилі 425 нм ($E_{\text{пит.}} = 500$) [1, 9, 10, 12, 16].

Відповідно до вмісту флавоноїдів (не менше 0,04%) у лікарській формі та з урахуванням вимог АНД (у нашому випадку $\pm 10\%$) ми обрали діапазон застосування методики від 80 до 120%. Симетричні допуски вмісту згідно з ДФУ становлять $\pm 10\%$ [6].

Спочатку було проведено теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально припустимої повної невизначеності методики, яка встановлює $\Delta A_s = 3,2$, максимальної систематичної похибки — $\text{max} \delta = 1,024$. Вне-сок плацебо у сумарну величину фонового погли-



Довжина хвилі

Рис. 1. Ультрафіолетовий спектр поглинання розчину препарату з алюмінію хлоридом.

нання є незначущим і ним можна знехтувати, коли виконується відношення $\delta_{\text{ex}} \leq 0,5\%$, критичне значення

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

критичне значення індексу кореляції — $R_c = 0,9236$, критичне значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності — $a = 5,12$ [2, 5, 13].

Максимум поглинання забарвленого комплексу випробуваного розчину з розчином алюмінію хлориду спостерігається при довжині хвилі 425 ± 2 нм (рис. 1). Це дає можливість використовувати довжину хвилі 425 нм у якості аналітичної для даної настойки [6].

Перед початком експерименту з валідації аналітичної методики, по-перше, запропонований метод було випробувано на стандартній речовині, у нашому випадку — гіперозиді. Перевірили лінійність стандартного розчину у діапазоні застосування методики від 80 до 120% з рівномірним розкидом концентрацій.

Отримані результати обробляли статистично методом найменших квадратів для прямої $Y = bx + a$. Розраховували статистичні величини: $b = 0,9731$; $S_b = 0,0204$; $a = 0,0015$; $S_a = 0,0008$; $S_r = 0,0004$ та $r = 0,9972$. Вимоги лінійності виконуються на усьому діапазоні застосування методики.

На основі отриманих результатів дійшли висновку, за даною методикою можна визначати вміст флавоноїдів у складній настійці "Гінекофіт".

Далі ми визначали за цією методикою вміст флавоноїдів методом спектрофотометрії. Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики за методом питомого показника поглинання. Вивчення характеру залежності оптичної густини від концентрації про-

водили, використовуючи 5 модельних розчинів для аналізу з рівномірним розкидом концентрацій на всьому діапазоні застосування методики (80, 90, 100, 110, 120%). Значення оптичної густини вимірювалося для кожної концентрації по 3 рази. Детальніше ця стандартизована процедура описана в роботі [13].

Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів згідно з вимогами ДФУ. Побудову калібрувального графіка проводили в нормалізованих координатах (рис. 3). Для кожного з п'яти 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 (коефіцієнт кореляції) (табл. 1). Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконуються на всьому діапазоні застосування методики (80-120%).

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності і правильності методики було одержано 15 значень оптичних густин модельних розчинів за схемою, наведеною в роботі. Розраховували фактичні величини ($X_{i\text{факт}}$), відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 15-ти розчинів до показника поглинання $A_{1\text{см}}^{1\%}$ (метод МПП). Величина $Z = \frac{X_i}{X_i} \times 100$ є знайденою концентрацією у відсотках до введеної. Результати розрахунків наведені в табл. 2.

Експериментальні результати збіжності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього та відповідно низьким стандартним відхиленням $Sz\%$ ($Sz\% = 1,269 \leq 3,2$) на всьому діапазоні концентрацій (80-120%), що свідчить про якість роботи аналітика та методики, яка застосовувалась.

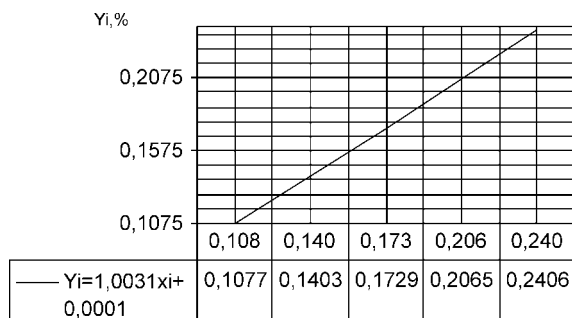


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації гіперозиду в нормалізованих координатах.

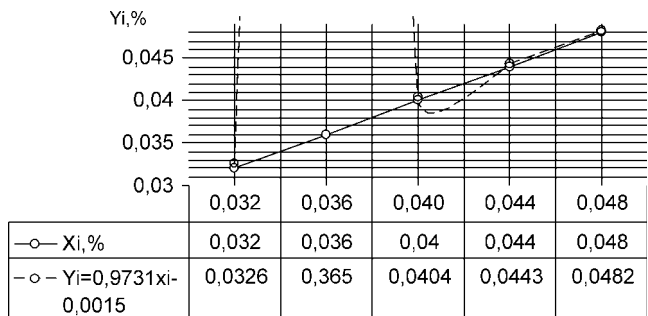


Рис. 3. Графік залежності оптичної густини від концентрації флавоноїдів у нормалізованих координатах.

Таблиця 1

Результати вивчення лінійності модельних розчинів та отримані параметри лінійної залежності

Модельний розчин	Об'єм аліквоти, мл	Введено	Оптичні густини A_i	Знайдено	Значення	$Y_i = bx_i + a$
1	2,4	0,032	0,158	0,033		0,0326
2			0,158	0,033		0,0326
3			0,158	0,033		0,0326
4	2,7	0,036	0,173	0,036		0,0365
5			0,173	0,036		0,0365
6			0,173	0,036		0,0365
7	3,0	0,04	0,197	0,041		0,0404
8			0,197	0,041		0,0404
9			0,197	0,041		0,0404
10	3,3	0,044	0,211	0,044		0,0443
11			0,211	0,044		0,0443
12			0,211	0,044		0,0443
13	3,6	0,048	0,230	0,048		0,0482
14			0,230	0,048		0,0482
15			0,230	0,048		0,0482
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b					0,9731	
S_b					0,0204	
Вільний член лінійної залежності a					0,0015	
S_a					0,0008	
Критичне значення для вільного члена лінійної залежності					5,12	
Залишкове стандартне відхилення S_{rest}					0,0004	
Критичне значення залишкового стандартного відхилення RSD_o					0,0059	
Коефіцієнт кореляції методики r					0,9972	
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції R_c					0,9236	

Таблиця 2

Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

Модельний розчин	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	0,032	0,158	0,033	102,15
2		0,158	0,033	102,99
3		0,158	0,033	102,29
4	0,036	0,173	0,036	99,86
5		0,173	0,036	99,62
6		0,173	0,036	99,69
7	0,04	0,197	0,041	102,40
8		0,197	0,041	102,40
9		0,197	0,041	102,40
10	0,044	0,211	0,044	100,88
11		0,211	0,044	100,32
12		0,211	0,044	99,25
13	0,048	0,230	0,048	100,37
14		0,230	0,048	100,33
15		0,230	0,048	100,37
Середнє Z%			101,02	
Відносне стандартне відхилення, S_z %			1,269	
Відносний довірчий інтервал, Δa_s %			2,722	
Критичне значення для збіжності результатів, Δa_s %			3,2	
Систематична похибка, δ			1,02	
Критерій невизначеності систематичної похибки			0,264	
Загальний висновок про методику			Коректна	

Таблиця 3

Стабільність досліджуваного розчину у часі

Розчин*	Термін дослідження стабільності t , хв					Середнє	RSD, %	Δ , %	max δ , %
	30	45	60	75	90				
Ai	0,2025	0,1964	0,1970	0,1971	0,1976	0,1981	1,2545	2,6743	1,024
Ai		0,1964	0,1970	0,1971	0,1976	0,1970	0,2499	0,5882	1,024

* - Значення оптичної густини є середнім значенням з трьох вимірювань розчину.

Систематична похибка методики МПП становить $\delta\% = 1,02$, що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення ($1,02 \leq \max\delta = 1,024$).

Перевірку стабільності аналітичного розчину проводили протягом години, починаючи відлік часу через 30 хв після приготування. Раціональним є запропонування вимірювання оптичної густини через 45 хв після приготування розчину. Отримані результати наведені в табл. 3. Розчин є стабільним протягом 1 год. Статистична оцінка впливу часу на аналізований розчин відповідає критеріям прийнятності.

Щоб дослідити відтворюваність методики МПП в умовах іншої лабораторії, нами було проведено вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні в різні дні у двох різних лабораторіях, до того ж різними аналітиками. Отримані результати є порівняння-

ми статистичних відхилень двох різних вимірювань і свідчать, що дана методика може бути коректно відтворена в іншій лабораторії та характеризується відносним довірчим інтервалом одиничного значення $100 \pm 0,4868\%$ з вірогідністю 95%. Величина $\Delta_{\text{intra}}\% = 0,4868 \leq 3,2$. Вимоги виконуються [3, 4].

Експериментальна частина

Спектрофотометричне кількісне визначення флавоноїдів у настійці складній “Гінекофіт” методом питомого показника поглинання проводили шляхом вимірювання оптичної густини A_i розчину випробовуваного зразка за обраною аналітично довжиною хвилі 425 нм. Симетричні допуски вмісту становлять $\pm 10\%$. Діапазон застосування аналітичної методики — $\pm 20\%$.

Для роботи використовувалось аналітичне обладнання: спектрофотометр “Specord-200”, ваги — METTLER TOLEDO, рН-метр — Іономір І-130. Для роботи використовували реактиви та мірний посуд класу А (першого класу), який відповідає вимогам ДФУ.

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

Методика кількісного визначення

3 мл препарату поміщали у круглодонну колбу місткістю 50 мл і випарювали на киплячій водяній бані під вакуумом при залишковому тиску 13-16 кПа до злегка вологого залишку. Вміст колби охолоджували до кімнатної температури, додавали 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну Р, 20 мл ацетону Р і 7 мл хлористоводневої кислоти Р1. Приєднували зворотний холодильник і нагрівали на водяній бані при температурі $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 30 хв. Розчин охолоджували до кімнатної температури, фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 50 мл, доводили об'єм розчину ацетоном Р до позначки і перемішували.

20 мл одержаного розчину поміщали у ділільну лійку місткістю 100 мл, додавали 20 мл води Р та екстрагували етилацетатом Р три рази порціями по 15 мл і ще раз 10 мл. Об'єднані в іншій ділільній лійці етилацетатні витяжки промивали водою Р два рази порціями по 50 мл і фільтрували у мірну колбу місткістю 50 мл крізь лійку зі складчастим паперовим фільтром з 10 г натрію сульфату безводного Р, попередньо змоченого етилацетатом Р. Об'єм розчину доводили етилацетатом Р до позначки і перемішували.

Таблиця 4

Результати дослідження відтворюваності методики

Випробовуваний розчин, №	Величини Z_i	
1	102,15	102,1
2	102,99	102,1
3	102,29	102,0
4	99,86	100,1
5	99,62	100,1
6	99,69	99,99
7	102,40	101,9
8	102,40	101,9
9	102,40	101,9
10	100,88	100,0
11	100,32	98,98
12	99,25	101,35
13	100,37	101,22
14	100,33	100,68
15	100,37	100,22
Середнє	101,02	100,97
Об'єднане середнє Z_{intra}	100,99	
$S_{\text{intra}}\%$	1,27	1,02
$SD_{\text{intra}}\%$	1,14	
Міжлабораторна систематична похибка δ	0,9953	
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{\text{intra}}\%$	0,4868	

10 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 1 мл алюмінію хлориду реактиву Р, доводили об'єм розчину 5% розчином (об/об) кислоти оцтової льодяної Р в метанолі Р до позначки і перемішували.

Через 30 хв вимірювали оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 425 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи в якості порівняння розчин, приготований аналогічно випробовуваному, але без додавання алюмінію хлориду реактиву Р.

Вміст суми флавоноїдів (X_1) у препараті у відсотках у перерахунку на гіперозид обчислювали за формулою:

$$X_1 = \frac{A \times 50 \times 50 \times 25 \times 100}{500 \times 100 \times V \times 20 \times 10} = \frac{A}{1,6 \times V},$$

де: A — світлопоглинання випробовуваного розчину; 500 — питомий показник поглинання комплексу гіперозиду з алюмінію хлоридом реактивом за довжини хвилі 425 нм [16]; V — об'єм препарату, мл.

Вміст суми флавоноїдів у препараті в перерахунку на гіперозид має бути не меншим за 0,04%.

Примітка. При використанні цієї методики для отримання коректних результатів обов'язково проводиться контроль оптичної густини спектрофотометрів по біхромату калію для виключення

впливу приладового фактора при застосуванні МПП [4].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту” [7, 8].

Висновки

1. Проведена валідація кількісного визначення флавоноїдів у складній настійці “Гінекофіт” методом спектрофотометрії (метод показника поглинання) за довжини хвилі 425 нм.

2. Здійснено валідацію запропонованої спектрофотометричної методики кількісного визначення флавоноїдів у складній настійці “Гінекофіт” відповідно до вимог ДФУ за такими валідаційними характеристиками: лінійність, правильність та збіжність, стабільність, внутрішньолабораторна точність.

3. Вимірювання оптичної густини раціонально починати через 45 хв після отримання комплексу з алюмінію хлоридом, який є стабільним протягом цього часу.

4. Метрологічні характеристики даної методики не перевищують критичного значення похибки (3,2) і характеризуються якісними аналітичними показниками. Дана методика може бути коректно відтворена в умовах лабораторій.

Література

1. Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. — 333 с.
2. Георгіяц В.А., Євтіфєєва О.А., Бочкарьова А.Ю. // Фармац. журн. — 2008. — №3. — С. 87-94.
3. Георгіяц В.А., Бисага Є.І., Євтіфєєва О.А. та ін. // Мед. хімія. — 2008. — Т. 10, №2. — С. 100-105.
4. Гризодуб А.И., Зволінская Н.Н., Архіпова Н.Н. // Фармаком. — 2004. — №2. — С. 20-34.
5. Гризодуб А.И. // Фармаком. — 2006. — №1/2. — С. 35-44.
6. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
7. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — 520 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: РІРЕГ, 2008. — 620 с.
9. Георгіяц В.А., Євтіфєєва О.А., Проскуріна К.І. // ЖОФХ. — 2008. — Т. 6, Вип. 1 (21). — С. 62-70.
10. Сур С.В., Макаренко О.Г., Герасимчук Г.В. // Фармац. журн. — 2001. — №4. — С. 85-89.
11. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. — М., 2007. — 57 с.
12. Петриненко В.М., Сухініна Т.В., Фурса Н.С. // Растительные ресурсы. — Т. 3, Вып. 2. — 2002. — С. 104-108.
13. Євтіфєєва О.А., Георгіяц В.А. // Фармаком. — 2007. — №1. — С. 69-81.
14. British Pharmacopoeia. — 2001. — Vol. 11, Appendix III. — A141-A144.
15. Deutsches Arzneibuch, 9 — Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 1986. — 1021 p.
16. European Pharmacopoeia. — 5-th ed. — Electronic version. — 2779 p.
17. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. — ICH Harmonised Tripartite Guideline. — Brussels, February 6-7, 2002.
18. The International Pharmacopoeia. — 3-th ed. — WHO, Geneva, 1979. — 223 p.
19. 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. — 2003.

Надійшла до редакції 23.12.2008 р.