

Рекомендована д. фармац. наук, проф. О. А. Євтіфєєвою

УДК 615.07:615.322: 615.451.1

## РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЛАВОНОЇДІВ У НАСТОЙЦІ

© К. О. Хохлова

Національний фармацевтичний університет, Харків

**Резюме:** для настойки «Атерофіт-норма» розроблено методику кількісного визначення суми флавоноїдів методом абсорбційної спектрофотометрії. Вивчено валідаційні характеристики методики: робасність, невизначеність пробопідготовки, діапазон застосування, лінійність, відтворюваність. Методика дозволяє об'єктивно визначити вміст суми флавоноїдів у настойці.

**Ключові слова:** флавоноїди, спектрофотометрія, валідаційні характеристики, настойка.

**Вступ.** Розповсюдженим підходом для стандартизації лікарських рослинних засобів є використання абсорбційної спектрофотометрії за методом показника поглинання. Для кількісного визначення суми флавоноїдів застосовують методику, яка ґрунтується на спектрофотометруванні аналітичного розчину після реакції комплексоутворення з алюмінію хлоридом [1–3, 5]. Відповідно до вимог ДФУ, при стандартизації необхідно застосовувати аналітичні методики, які пройшли процедуру валідації та відповідають валідаційним критеріям [4].

Метою цієї роботи було на стадії розробки та апробації методики кількісного визначення суми флавоноїдів настойки «Атерофіт-норма» визначити такі валідаційні характеристики, як: робасність, невизначеність пробопідготовки, діапазон застосування, лінійність, відтворюваність.

**Методи дослідження.** Об'єктом дослідження обрано настойку «Атерофіт-норма», що містить плоди глоду, листя та квітки глоду, суцвіття коношини лучної, траву сухоцвіту багнового у співвідношенні (3:2:3:2), екстрагент – етанол 50 %, співвідношення сировина – готовий продукт 1:10. У роботі використовували спектрофотометр, 101 UV, виробник «ULAB», Китай, кювети, 881049052; ваги аналітичні Kern ABJ 220-4M; водяну баню HWS 12; мірний посуд класу А, який відповідає вимогам ДФУ [4]. Статистичну обробку результатів хімічного експерименту проводили відповідно до вимог ДФУ [4].

Методика спектрофотометричного визначення суми флавоноїдів у настойці «Атерофіт-норма».

**Випробовуваний розчин.** 1.0 мл розчину настойки поміщають у мірну колбу на 50.0 мл, додають 10 мл 70 % етанолу, 2 мл 5 % розчину алюмінію хлориду, перемішують, через 10 хв додають 2 мл 5 % розчину кислоти оцтової в етанолі, доводять

об'єм розчину 70 % етанолом до мітки і перемішують.

**Компенсаційний розчин.** 1.0 мл препарату поміщають у мірну колбу на 50.0 мл, додають 10 мл 70 % етанолу, 2 мл 5 % розчину кислоти оцтової в етанолі, доводять об'єм розчину 70 % етанолом до мітки і перемішують.

Через 45 хв вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 408 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

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

$$X_{\%} = \frac{A \cdot 50}{220}, \text{ де } A - \text{оптична густина випробовуваного розчину; } 220 - \text{питомий показник поглинання рутину з алюмінію хлоридом Р у 70 \% етанолі при довжині хвилі 408 нм.}$$

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин має бути не менше 0.06 %.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин має бути не менше 0.06 %.

Приготування 5 % розчину кислоти оцтової в етанолі: 5.0 мл кислоти оцтової льодяної Р поміщають у мірну колбу на 100 мл, доводять об'єм розчину 70 % етанолом до мітки і перемішують. Термін придатності – 7 діб.

Приготування 5 % розчину алюмінію хлориду: 5.0 г алюмінію хлориду Р поміщають у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у 70 мл 70 % етанолу, доводять об'єм розчину 70 % етанолом до мітки і перемішують. Термін придатності розчину – 1 міс. в захищеному від світла місці.

Приготування розчину стандартного зразка (СЗ) рутину: близько 0.05 г (т.н.) СЗ рутину поміщають у мірну колбу на 100 мл і додають 80 мл етанолу 96 %. Розчиняють при нагріванні на водяній бані та постійному перемішуванні. Після повного розчинення рутину розчин охолоджу-

ють, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки та перемішують.

**Результати й обговорення.** Для розробки методики кількісного визначення суми флавоноїдів у настійці «Атерофіт-норма» було необхідно підібрати аліквоту препарату, що беруть для аналізу, розведення випробовуваного та компенсаційного розчинів, умови спектрофотометрування, визначити час, в якому оптична густина випробовуваного розчину є стабільною [1, 2].

На рисунках 1, 2 наведено спектри поглинання випробовуваного розчину настійки «Атерофіт-норма» та розчину СЗ рутину, отримані за методикою.

Як видно з рисунків 1, 2, максимуми поглинання випробовуваних розчинів досліджуваної настійки і розчину СЗ рутину спостерігаються у діапазоні (408±2) нм, що підтверджує можливість проведення перерахунку суми флавоноїдів у препараті на рутин і проведення аналізу при даній довжині хвилі.

Для розрахунку вмісту суми флавоноїдів за спектрофотометричною методикою використовували питомий показник рутину, що дорівнює 220 [2]. Проводили визначення відтворюваності питомого показника поглинання рутину в умовах дослідної лабораторії. Для цього було проведено 30 вимірювань оптичної густини СЗ рутину на використовуваному спектрофотометрі [4]. За отриманими результатами відтворюваності оптичної густини рутину  $A_{\text{сеп.}} = 0.4367$ ;  $s_{\text{a,r}} = 0.11\%$ , питомий показник поглинання рутину склав  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 220.6$ .

Важливим при розробці методики є дослідження впливу розчинників на значення оптичної густини, для чого тричі вимірювали оптичну густина випробовуваного розчину та компенсаційного розчину відносно розчину, що містить

70 % етанол та 5 % розчин кислоти оцтової в етанолі. За результатами трьох паралельних дослідів отримано такі значення:  $A_{\text{компенс.}} = 0.1832$ ,  $A_{\text{випр.}} = 0.7567$ . Відношення оптичних густин випробовуваного і компенсаційного розчинів становить 24.21 %. Отже, значення оптичної густини компенсаційного розчину значно впливає на результати аналізу і залежить від точності відбирання аліквоти настійки.

Розрахунки невизначеності аналітичної методики проводили відповідно до вимог ДФУ [4]. Виходячи із допусків вмісту діючих речовин  $\pm 10\%$ , були розраховані максимально допустима повна невизначеність методики  $\text{max}\Delta_{\text{As}} = 3.2\%$ , максимальна систематична похибка  $\delta_{\text{max}} = 1.02\%$ . Результати розрахунку невизначеності пробопідготовки і повної невизначеності аналітичної методики наведено в таблиці 1. Встановлено, що основний внесок у повну невизначеність методики спектрофотометричного визначення суми флавоноїдів належить пробопідготовці – 0.88 %.

При розробці методик необхідно вивчати стійкість результатів аналізу до впливу різноманітних факторів – *робастність*. Для досліджуваної методики такими факторами є час перебігу колориметричної реакції та вплив рН досліджуваного розчину. За методикою проводять підкислення випробовуваного розчину кислотою оцтовою, що дозволяє задати необхідні умови для стабілізації комплексу й умов проведення аналізу. Тому прогнозованим є те, що відхилення у рН настійки на  $\pm 10\%$  не впливає на кінцевий результат аналізу. Стабільність оптичної густини випробовуваного розчину визначали у період 45–65 хв після додавання реактиву, оскільки відомо, що стійкий комплекс флавоноїдів з алюмінієм (III) хлоридом утворюється не менше ніж через 45 хв [1]. Метрологічні характеристики визначення оптичної густини у часі склали:  $\text{RSD}_t$ ,

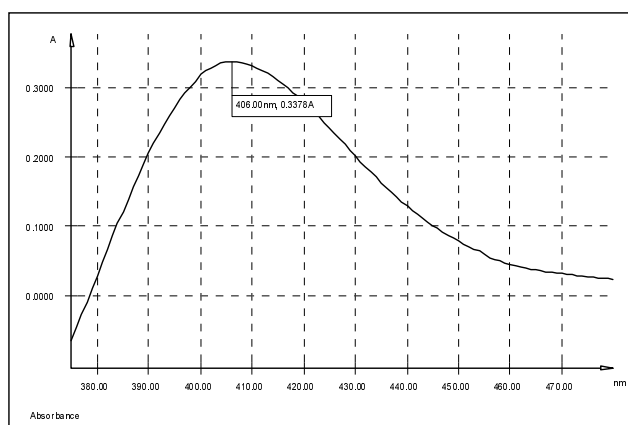


Рис. 1. Спектр поглинання випробовуваного розчину настійки.

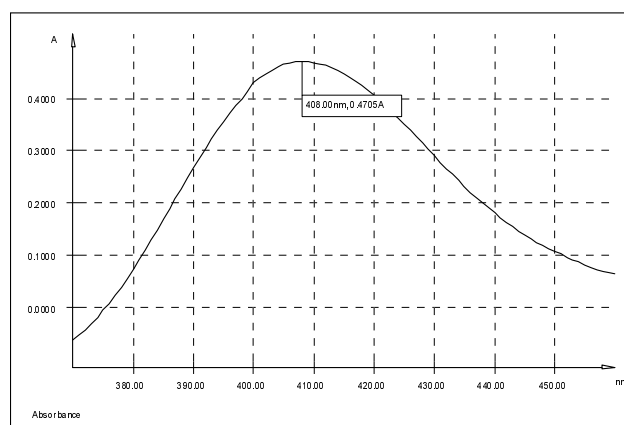


Рис. 2. Спектр поглинання розчину стандартного зразка рутину.

= 0.56 %,  $\Delta_i$ , % = 1.19 %, що не перевищує  $\delta_{\max}$ , % = 1.02. Отже, вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину настойки доцільно проводити в інтервалі 45 – 65 хв після додавання реактиву, коли комплекс є стабільним.

Для досліджуваної методики обрано діапазон застосування 70–130 % відносно кількості настойки «Атерофіт-норма», яку беруть для аналізу, що відповідає 0.7–1.3 мл. Для визначення лінійності, збіжності та відтворюваності були оцінені результати 15 значень оптичних густин випробовуваних розчинів для п'яти різних концентрацій. Дослідження проводили у двох різних лабораторіях у різні дні та різні аналітики. Оцінку метрологічних параметрів збіжності та лінійності проводили за принципом введено-знайдено (табл. 1) [4].

Величину X розраховували як відношення взятої аліквоти (у діапазоні застосування 0.7-

1.0 мл) *i*-го розчину до номінального (1.0 мл). Величину Y розраховували як відношення оптичної густини *i*-го розчину до оптичної густини номінального, а значення Z – як відношення величин X та Y для *i*-го розчину:

$$X_i = \frac{V_i}{V_{\text{ном.}}} \cdot 100\%; \quad Y_i = \frac{A_i}{A_{\text{ном.}}} \cdot 100\%;$$

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%, \quad \text{де } V_i - \text{об'єм } i\text{-го випробову-$$

ваного розчину, що беруть для аналізу;  $V_{\text{ном.}}$  – об'єм випробовуваного розчину, що беруть для аналізу за методикою (1 мл);  $A_i$  – оптична густина *i*-го випробовуваного розчину;  $A_{\text{ном.}}$  – оптична густина випробовуваного розчину, що беруть для аналізу за методикою (1 мл).

**Таблиця 1.** Валідаційні характеристики методики кількісного визначення суми флавоноїдів настойки

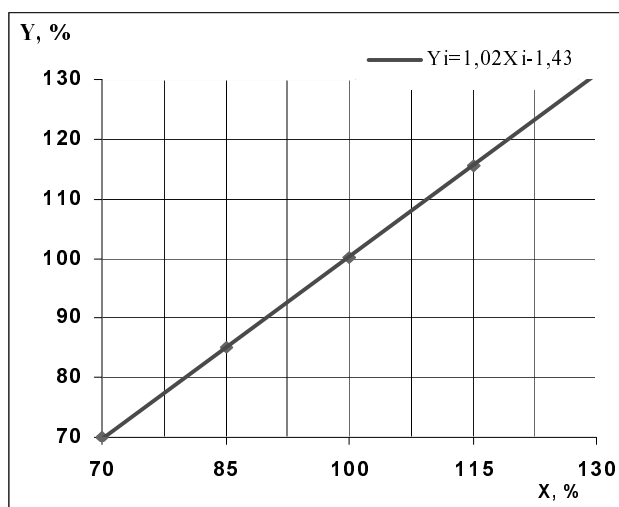
№ досліду	V, мл	X <sub>i</sub> , %	Лабораторія 1		Лабораторія 2	
			A <sub>i</sub>	Z <sub>i</sub>	A <sub>i</sub>	Z <sub>i</sub>
1	0.70	70.00	0.2594	99.56	0.265	100.95
2	0.70	70.00	0.2602	99.87	0.267	101.71
3	0.70	70.00	0.2608	100.10	0.265	100.95
4	0.85	85.00	0.3165	100.04	0.320	100.39
5	0.85	85.00	0.3172	100.26	0.319	100.08
6	0.85	85.00	0.3159	99.85	0.322	101.02
7	1.00	100.00	0.3724	100.05	0.376	100.27
8	1.00	100.00	0.3719	99.92	0.375	100.00
9	1.00	100.00	0.3726	100.11	0.373	99.47
10	1.15	115.00	0.4289	100.20	0.432	100.17
11	1.15	115.00	0.4296	100.37	0.435	100.87
12	1.15	115.00	0.4305	100.58	0.433	100.41
13	1.30	130.00	0.4867	100.59	0.492	100.92
14	1.30	130.00	0.4875	100.75	0.489	100.31
15	1.30	130.00	0.4882	100.90	0.491	100.72
<i>Лінійність</i>						
	<i>b</i>		1.02		1.00	
	<i>a</i>		-1.43		0.43	
	<i>r</i>		0.9998		0.9998	
<i>Збіжність і відтворюваність</i>						
	<i>Z</i> <sub>середнє</sub> , %		100.21		100.55	
	Об'єднане <i>Z</i> <sub>середнє</sub> , %		100.38			
	<i>Sz</i> , %		0.37		0.55	
	$\Delta z$ , %		0.65		0.96	
Невизначеність пробопідготовки: $\Delta_{SP} = \sqrt{0.17^2 + 0.6^2 + 0.17^2 + 0.6^2} \approx 0.88\%$						
Повна невизначеність аналітичної методики: $\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = 1.02\%$						

На рисунку 3 А, Б наведено графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації суми флавоноїдів у настійці у нормалізованих координатах для двох лабораторій.

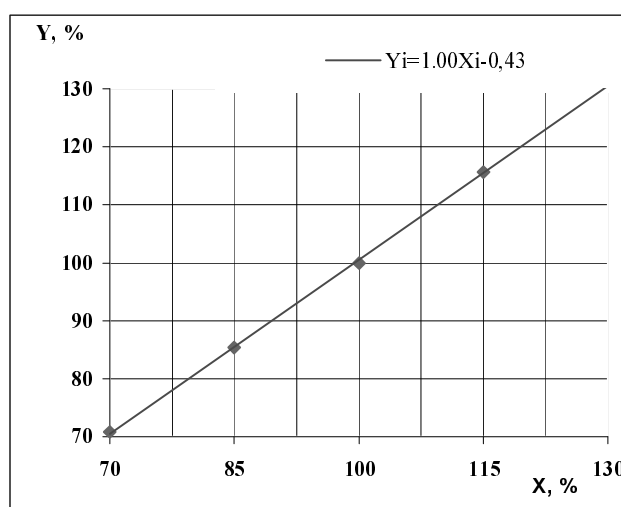
Отримані результати кутового коефіцієнта, вільного члена лінійних рівнянь, коефіцієнта кореляції підтверджують лінійний статистичний зв'язок між кількістю настійки, що беруть для аналізу, та оптичною густиною.

При вивченні збіжності та відтворюваності розраховували середнє значення, відносне стандартне відхилення і відносний довірчий інтервал (табл. 1). Значення відносного стан-

дартного відхилення та довірчого інтервалу у двох різних лабораторіях не перевищує значення максимальної невизначеності методики. Методика відповідає вимогам до аналітичних методик, оскільки:  $\Delta_z\% \leq \max\Delta_{As} = 3.2\%$ ;  $Sz, \% = 0.37$  і  $0.55$ ;  $\Delta z, \% = 0.65$  і  $0.96$ , що не перевищує критерії прийнятності. За запропонованою методикою розраховано фактичні дані вмісту суми флавоноїдів настійки «Атерофіт-норма», які склали  $0,0846\%$  для першої і  $0,0852\%$  для другої лабораторії, що відповідає встановленій регламентації вмісту речовин.



А



Б

Рис. 3. Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації суми флавоноїдів у настійці: А – лабораторія 1; Б – лабораторія 2

**Висновки.** Розроблено та провалідовано методику кількісного визначення суми флавоноїдів настійки «Атерофіт-норма» методом спектрофотометрії за показником поглинання. Отримані метрологічні дані свідчать, що методика може

бути відтворена в різних лабораторіях з довірчою вірогідністю  $95\%$ , середній результат аналізу складає  $100.38 \pm 0.81\%$ . Методика буде використана при встановленні специфікації на настійку.

#### Література

1. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів методом УФ-спектрофотометрії у настійці складній «Бронхофіт» / Л. І. Вишневська, О. А. Євтіфеева, С. В. Гарна [та ін.] // Український медичний альманах. – 2010. – Т. 13, № 1. – С. 33–35.
2. Вишневська Л. І. Валідація методики кількісного визначення флавоноїдів в оральних краплях урохол / Л. І. Вишневська, М. С. Вишневська, К. О. Хохлова // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – Т. 11, № 3. – С. 18–23.
3. Гризодуб А. І. Особенности фармакопейных подходов к количественному определению лекарственных

- ного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов / А. И. Гризодуб, О. А. Евтифеева, К. И. Проскурина // Фармаком. – 2012. – № 3. – С. 7–31.
4. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., доп. 1. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 520 с.; доп. 2. – Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
5. Чубка М. Б. Порівняльні можливості застосування різних спектрофотометричних методик для визначення флавоноїдів / М. Б. Чубка, Л. В. Вронська, Л. Т. Котляренко // Фармацевтичний часопис. – 2010. – № 3. – С. 51–61.

## **РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В НАСТОЙКЕ**

**Е. А. Хохлова**

*Национальный фармацевтический университет, Харьков*

**Резюме:** для настойки «Атерофит-норма» разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом абсорбционной спектрофотометрии. Изучены валидационные характеристики методики: робастность, неопределенность пробоподготовки, диапазон применения, линейность, воспроизводимость. Методика позволяет объективно определить содержание суммы флавоноидов в настойке.

**Ключевые слова:** флавоноиды, спектрофотометрия, валидационные характеристики, настойка.

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE OF FLAVONOIDS IN THE DETERMINATION OF THE AMOUNT TINCTURE**

**К. О. Khokhlova**

*National University of Pharmacy, Kharkiv*

**Summary:** the assay of flavonoids in the «Atherophyt-norma» tincture was developed by the method of absorbtion spectrophotometry. Such validation characteristics as robustness, uncertainty of sample preparation, range, linearity, precision were studied. The method allows to determine the sum of flavonoids in the tincture fairly.

**Key words:** flavonoids, spectrophotometry, validation characteristics, tincture.

Отримано 11.11.13