

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2026 р.

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ АЛЬТЕРНАТИВНОЇ МЕТОДИКИ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧОЇ РЕЧОВИНИ В
«РЕЗІСТОЛ®-ТАБ»**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Прудіус Олени Романівни

Науковий керівник від кафедри

канд. біол.наук Кот Л.І.

Робота виконана на базі аналітичної лабораторії Дослідного центру
АТ «Київмедпрепарат» під керівництвом старшого хіміка-аналітика
Шевцової Аліни Олександрівни

Оцінка захисту роботи

Київ — 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДФУ	–	Державна Фармакопея України
ЄС	–	Європейський Союз
ЄФ	–	Європейська Фармакопея
ЛЗ	–	лікарський засіб
ОГ	–	оптична густина

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Екстракт коренів <i>Pelargonium sidoides</i> DC. та <i>pelargonium reniforme</i> Curtis, як фармакологічно активні речовини.....	7
1.1. Терапевтична ефективність та безпека екстрактів <i>Pelargonium sidoides</i> DC. і <i>Pelargonium reniforme</i> Curtis.....	8
1.2. Поліфенольний склад екстрактів коренів пеларгонії та їх біологічна активність.....	11
РОЗДІЛ 2. Методи кількісного визначення поліфенольних сполук у екстрактах коренів <i>Pelargonium sidoides</i> dc. та <i>Pelargonium reniforme curtis</i> і підходи до їх валідації.....	14
2.1. Сучасні методи кількісного визначення поліфенольних сполук у рослинних екстрактах.....	14
2.2. Валідація аналітичних методів: історичні аспекти та сучасні вимоги.....	18
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень.....	22
3.1. Реактиви та матеріали.....	22
3.2. Методика кількісного визначення для контролю якості лікарського засобу «Резістол [®] -Таб» (методика 1).....	23
3.3. Підготовка зразків для валідації.....	25
3.3.1. Підготовка зразків для оцінювання специфічності (випробування № 1).....	25
3.3.2. Підготовка зразків для оцінювання лінійності (випробування № 2).....	26
3.3.3. Підготовка зразків для оцінювання правильності (випробування № 3).....	27
3.4. Статистична обробка результатів.....	28
РОЗДІЛ 4. Результати досліджень та обговорення.....	29
4.1. Результати розробки аналітичної методики.....	29

	4
4.1.1. Визначення оптимального часу екстрагування випробуваних розчинів	29
4.1.2. Дослідження кінетики реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом	31
4.2. Результати валідації аналітичної методики	32
4.2.1. Оцінювання специфічності аналітичної методики	37
4.2.2. Оцінювання лінійності аналітичної методики	40
4.2.3. Оцінювання правильності аналітичної методики	43
4.2.4. Оцінювання збіжності аналітичної методики	45
4.2.5. Оцінювання внутрішньолабораторної прецизійності аналітичної методики	47
4.2.6. Оцінювання робастності аналітичної методики	51
ВИСНОВКИ	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55

ВСТУП

Екстракт коренів *Pelargonium sidoides* DC та/або *Pelargonium reniforme* Curtis є основою багатьох лікарських засобів (ЛЗ), які застосовуються для лікування захворювань дихальних шляхів. Відомо, що цей екстракт виявляє антибактеріальну активність та чинить імуномодулювальний ефект, зокрема регулює рівень прозапальних цитокінів [1]. Окрім прямої дії на збудників, ефективність екстракту може бути зумовлена опосередкованими механізмами, які реалізуються через взаємодію з клітинами організму, зокрема шляхом впливу на адгезію та взаємодію патогенів з епітеліальними клітинами дихальних шляхів [2]. Одним із препаратів цієї групи є ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг).

Контроль якості лікарських засобів на основі рослинних екстрактів є складним завданням у зв'язку з їх багатокомпонентним складом та природною варіабельністю вмісту біологічно активних речовин. Впроваджена методика оцінки якості ЛЗ «Резістол[®]-Таб» базується на кількісному визначенні сумарного вмісту умкаліну та його похідних, які виробником субстанції (сухого екстракту коренів пеларгонії) визначено як аналітичні маркери продукту.

Водночас, відповідно до монографії Європейської фармакопеї (ЄФ) *Pelargonium root (Pelargonii radix)*, рослинну сировину стандартизують за вмістом танінів, як і всі ЛЗ на основі екстракту коренів пеларгонії, представлені на ринку Європейського Союзу (ЄС). Згідно з Директивою 2001/83/ЕС, рослинні ЛЗ можуть бути зареєстровані як препарати традиційного застосування (без проведення клінічних досліджень) за умови підтвердження їх якості та тривалого використання (не менше 15 років) [2-3]. У зв'язку з цим виникла необхідність розробки та валідації аналітичної методики, яка відповідає б сучасним регуляторним вимогам, забезпечувала можливість стандартизації препарату відповідно до вимог ЄФ та могла бути

використана як більш доступна й економічно доцільна альтернатива існуючим аналітичним підходам.

Метою роботи було розробити та валідувати альтернативну методику кількісного визначення діючої речовини – сухого екстракту коренів пеларгонії – для контролю якості ЛЗ «Резістол[®]-Таб» шляхом визначення вмісту танінів із подальшим перерахунком на вміст діючої речовини.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Розробити методику кількісного визначення танінів у лікарському засобі, включаючи експериментальне обґрунтування умов пробопідготовки, зокрема визначення оптимальної тривалості екстрагування, що забезпечує повноту вилучення танінів, а також встановити кінетичні закономірності реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом з метою обґрунтування часу дериватизації розчинів;

2. Провести метрологічне оцінювання розробленої методики для підтвердження її придатності, зокрема виконати розрахунок максимально допустимої невизначеності результату аналізу ($\max\Delta_{As}$), невизначеності пробопідготовки та сумарної невизначеності аналізу;

3. Провести валідацію методики за такими характеристиками: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність (збіжність), внутрішньолабораторна прецизійність та робасність.

Практичне значення виконаної роботи полягало в тому, що розроблена альтернативна методика кількісного визначення діючої речовини шляхом визначення вмісту танінів із подальшим перерахунком на вміст діючої речовини відповідала вимогам ЄФ та забезпечувала можливість реєстрації ЛЗ «Резістол[®]-Таб» у країнах ЄС на умовах традиційного застосування відповідно до Директиви 2001/83/ЄС. Запропонована методика є доступною та економічно доцільною, не потребувала використання дорогих реактивів і складного обладнання, а її валідаційні характеристики підтверджують придатність для рутинного контролю якості.

РОЗДІЛ 1

ЕКСТРАКТ КОРЕНІВ *PELARGONIUM SIDOIDES DC.* ТА *PELARGONIUM RENIFORME CURTIS*, ЯК ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ

У сучасному світі, попри стрімкий розвиток синтетичної фармакології, природні ЛЗ залишаються важливим джерелом біологічно активних сполук та основою для створення ефективних фітопрепаратів. Особливий інтерес представляють види з доведеною традиційною ефективністю, яка отримала наукове підтвердження. До таких належать два близькоспоріднені південноафриканські види – *Pelargonium sidoides DC.* та *Pelargonium reniforme Curtis* (родина *Geraniaceae*), наукові уявлення про які активно розвиваються впродовж останніх десятиліть [1].

Pelargonium sidoides є прикладом успішної трансформації традиційного ЛЗ в сучасний стандартизований фітопрепарат. Її кореневища, що історично застосовувалися для лікування туберкульозу та кишкових розладів, стали сировиною для отримання стандартизованого екстракту коренів пеларгонії. Клінічні дослідження підтвердили його ефективність при лікуванні гострого бронхіту. Вважається, що фармакологічна активність зумовлена комплексом поліфенольних сполук, зокрема олігомерних та полімерних проантоціанідинів, високоокислених кумаринів та флавоноїдів, які містяться в коренях рослини [4].

Не менш цінним є вид *Pelargonium reniforme*, корені якого також входять до складу стандартизованого екстракту коренів пеларгонії та широко використовуються в народній медицині для лікування кашлю, діареї, туберкульозу та захворювань печінки. Однак, інтенсивне використання цієї рослини у фармацевтичній промисловості призвело до зменшення природних популяцій і підвищення ризику її зникнення. Дослідження показують, що лікувальні властивості *P. reniforme* також зумовлені наявністю

поліфенольних сполук, зокрема фенольних кислот (наприклад, галлової), кумаринів (зокрема, умкаліну), флавоноїдів та танінів [1, 4-5].

Історичний шлях обох видів від традиційного застосування до сучасних фармацевтичних препаратів є визначним. Їх використання в медицині народів Південної Африки сягає століть. Важливим етапом стало ввезення кореня пеларгонії до Європи наприкінці ХІХ століття як засобу проти туберкульозу. Починаючи з 1970-х років, екстракти кореня пеларгонії стали широко застосовуватися в Німеччині для лікування гострих респіраторних захворювань, зокрема бронхіту. У 2005 році відповідні препарати отримали офіційний дозвіл на медичне застосування у Німеччині, а у 2008 році рослинну сировину було включено до європейських фармакопейних та регуляторних переліків лікарських рослин [6].

На сьогодні в країнах ЄС препарати на основі цих рослин переважно зареєстровані як традиційні рослинні лікарські засоби. Такий статус базується на підтвердженні їх тривалого (понад 30 років, включаючи щонайменше 15 років у ЄС) безпечного використання для симптоматичного лікування застудних захворювань відповідно до спрощеної процедури, передбаченої Директивами 2001/83/ЄС [3]. Водночас у деяких країнах ці препарати мають повний маркетинговий дозвіл для застосування при гострому бронхіті [1].

1.1. Терапевтична ефективність та безпека екстрактів *Pelargonium sidoides* DC. і *Pelargonium reniforme* Curtis

Терапевтична ефективність екстракту коренів пеларгонії ґрунтується на комплексі біологічних ефектів, виявлених у доклінічних дослідженнях [1]. Згідно з сучасними оглядовими даними, екстракт характеризується широким спектром фармакологічної активності, що в сукупності забезпечують його клінічну ефективність за умов гострих респіраторних інфекцій [7].

Зокрема, дослідження *in vitro* вказують на здатність екстракту інгібувати ріст таких респіраторних патогенів, як *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* та *Mycobacterium tuberculosis*. Для окремих ізольованих кумаринів, зокрема умкаліну, встановлено значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) у межах 200–500 мкг/мл. Водночас ця активність є суттєво нижчою порівняно зі стандартними антибіотиками, а концентрації екстракту, необхідні для досягнення ефекту *in vitro* (1-10 мг/мл), значно перевищують умовно клінічно релевантний поріг (близько 100 мкг/мл) для рослинних екстрактів. Таким чином, прямий антимікробний ефект не розглядається як основний механізм терапевтичної дії [1,7-8].

Основне обґрунтування терапевтичної ефективності пов'язане з імуномодулюючими, противірусними та антиадгезивними властивостями екстракту. Доклінічні дослідження показали його здатність активувати неспецифічні механізми імунного захисту, зокрема підвищувати фагоцитарну активність клітин, стимулювати окиснювальний вибух та регулювати секрецію цитокінів (TNF- α та IFN- β). Важливе значення має інтерферон-індукуюча активність, що забезпечує активацію вродженого імунітету та експресію інтерферон-стимульованих генів, важливих для противірусного захисту [8, 10-11]. Крім того, екстракт знижує адгезивну здатність бактерій до епітеліальних клітин дихальних шляхів, обмежуючи їх первинну колонізацію та подальший розвиток інфекційного процесу [12].

Клінічні дослідження підтверджують ефективність екстракту коренів пеларгонії при широкому спектрі гострих респіраторних інфекцій. У рандомізованих подвійних сліпих плацебо-контрольованих дослідженнях доведено його ефективність при гострому бронхіті у дорослих та дітей, гострому тонзилофарингіті, риносинуситі та застудних захворювань. У пацієнтів із хронічним обструктивним захворюванням легень застосування екстракту як додаткової терапії сприяло збільшенню до загострення, зменшенню частоти загострень та зниженню потреби в антибіотиках [8, 12, 16].

Таким чином, терапевтична дія екстракту зумовлена насамперед його здатністю модулювати імунну відповідь організму та порушувати адгезію патогенів. Поєднання противірусних та імуномодулюючих ефектів дозволяє забезпечувати вплив як на ранні, так і пізні стадії гострих респіраторних інфекцій [6, 17].

Профіль безпеки екстракту коренів пеларгонії добре вивчений у клінічних дослідженнях і в рамках фармаконагляду. Загалом короткочасне застосування у рекомендованих дозах характеризується доброю переносимістю. Найчастіше спостерігаються легкі або помірні побічні реакції з боку шлунково-кишкового тракту (нудота, біль у животі, діарея), які як правило, мають транзиторний характер і можуть бути пов'язані з наявністю танінів у складі екстракту. Водночас описано поодинокі випадки розвитку серйозних алергічних реакцій, зокрема кропив'янки, ангіоневротичного набряку та бронхоспазму [1]. Незважаючи на їх рідкісність, можливість виникнення таких реакцій потребує відповідної клінічної настороженості.

Попри те, що деякі класи кумаринів асоціюються з гепатотоксичністю, специфічні 7-гідроксикумарини, наявні в екстракті пеларгонії, не виявляють подібної дії. Доклінічні дослідження на тваринах та *in vitro* (на культурах гепатоцитів людини) не підтвердили гепатотоксичного потенціалу екстракту [1-2]. Крім того, відсутні дані щодо клінічно значущих взаємодій з антикоагулянтами (зокрема варфарином) та підвищення ризику кровоточивості, що пов'язано з особливостями хімічної структури кумаринів пеларгонії [1].

Отже, екстракти *P. sidoides* та *P. reniforme* характеризуються комплексною фармакологічною дією, що включає імуномодулювальні, противірусні та антиадгезивні ефекти, які зумовлюють їх ефективність у симптоматичному лікуванні неускладнених респіраторних інфекцій. Водночас вони мають сприятливий профіль безпеки при короткочасному застосуванні, а обмежувальним чинником залишається ризик рідкісних

алергічних реакцій. Відсутність гепатотоксичності та впливу на систему гемостазу додатково підтверджує їх безпечність.

1.2. Поліфенольний склад екстрактів коренів пеларгонії та їх біологічна активність

На сучасному фармацевтичному ринку ЄС препарати на основі кореня пеларгонії представлені переважно у двох лікарських формах: рідких екстрактах та сухих екстрактах з різним ступенем концентрування [1].

Хімічний склад екстракту є комплексним і включає кілька взаємопов'язаних груп біологічно активних поліфенольних сполук. Як свідчать сучасні дослідження, фенольний профіль *P. sidoides* та *P. reniforme* може варіювати залежно від умов вирощування рослин та екстрагента, що підкреслює важливість стандартизації рослинної сировини [18, 19]. Окрім танінів, вміст яких регламентований Європейською Фармакопеею (ЄФ) на рівні не менше 2% (у перерахунку на пірогалол), важливу роль відіграють й інші класи сполук [2].

Характерними маркерами для ідентифікації сировини роду *Pelargonium* є унікальні високоокислені кумарини, зокрема умкалін (6-гідрокси-5,7-диметоксикумарин) та скополетин [20]. Згідно з дослідженнями Viljoen [21], умкалін є маркерною сполукою для *P. sidoides*, тоді як скополетин переважає у *P. reniforme*, що дозволяє диференціювати ці види. Показано, що кумарини, зокрема умкалін, проявляють антиоксидантну та імуномодулюючу активність, зокрема здатні стимулювати синтез оксиду азоту (NO) макрофагами, що є важливим механізмом захисту від внутрішньоклітинних патогенів [22].

Вагомий внесок у фармакологічну активність екстракту здійснюють фенольні кислоти, зокрема галова кислота та її похідні. Вони не лише виступають попередниками у біосинтезі танінів, але й самі характеризуються

вираженою антиоксидантною та антимікробною активністю. Окремі похідні галової кислоти, виділені з *P. reniforme*, показали активність щодо мікобактерій [23-24].

Флавоноїди, такі як катехіни, кверцетин, рутин, та проантоціанідини (конденсовані таніни) здатні синергічно посилювати антиоксидантний потенціал екстракту, а також інгібують адгезію бактерій і вірусів до слизових оболонок, що частково пояснює ефективність препаратів за респіраторних інфекцій [11].

Таніни – це поліфенольні сполуки вторинного метаболізму, які поділяються на дві основні групи: гідролізовані (ефіри фенольних кислот із цукрами) та конденсовані (проантоціанідини – полімери флаван-3-олів) [25]. Їх біологічна активність обумовлена здатністю утворювати міцні комплекси з білками, полісахаридами та йонами металів завдяки наявності великої кількості гідроксильних груп [26]. Вони виявляють виражену антиоксидантну активність, зокрема шляхом зв'язування вільних радикалів, інгібування перекисного окиснення ліпідів та хелатування йонів металів, що каталізують окисні процеси. Це зумовлює їх кардіопротекторні ефекти, включаючи інгібування окиснення ліпопротеїнів низької щільності та покращення ендотеліальної функції. Крім того, таніни характеризуються антимікробними та антивірусними властивостями, зокрема за рахунок порушення структури клітинних мембран мікроорганізмів та інгібування адгезії патогенів, що визначає їх перспективність як допоміжних засобів у терапії інфекцій [11, 25-27].

Таніни виявляють протизапальну, протипухлинну та антипаразитарну дію, а також позитивно впливають на функціональний стан шлунково-кишкового тракту, зокрема шляхом модуляції складу мікробіоти та покращення бар'єрної функції кишечника [27-28].

Водночас біодоступність високомолекулярних танінів є обмеженою, оскільки вони зазнають значних біотрансформацій за дії кишкової мікробіоти з утворенням низькомолекулярних метаболітів [1]. У зв'язку з цим кількісне

визначення танінів, зокрема для підтвердження відповідності фармакопейним вимогам, є важливим етапом аналітичного контролю якості як рослинної сировини, так і готових ЛЗ. Це обумовлює актуальність розробки та впровадження точних і відтворюваних методів їх аналізу для забезпечення стандартизації та ефективності фітопрепаратів на основі пеларгонії [2, 27].

РОЗДІЛ 2
МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ
СПОЛУК В ЕКСТРАКТАХ КОРЕНІВ *PELARGONIUM SIDOIDES DC.*
ТА *PELARGONIUM RENIFORME CURTIS* І ПІДХОДИ ДО ЇХ
ВАЛІДАЦІЇ

2.1. Сучасні методи кількісного визначення поліфенольних сполук у
рослинних екстрактах

Кількісне визначення поліфенольних сполук є важливим етапом оцінки якості рослинних екстрактів, оскільки саме вони значною мірою зумовлюють їх біологічну активність. Поліфеноли здатні діяти синергічно, забезпечуючи антиоксидантні, протизапальні та антимікробні ефекти [28]. Контроль їх загального вмісту дозволяє забезпечити стабільність терапевтичної дії препаратів, тоді як визначення лише окремих маркерних сполук не завжди адекватно відображає їх фармакологічний потенціал. Сучасна фармакогнозія пропонує три основні підходи до оцінки якості поліфенолвмісної сировини: колориметричне визначення загального вмісту фенолів, хроматографічний аналіз окремих маркерних сполук та функціональні біохімічні тести для оцінки біологічної активності.

Одним із базових підходів є колориметричне визначення загального вмісту поліфенолів за методом Фоліна–Чокальте, розробленим у 1927 р. та вдосконаленим Сінглтоном і Россі у 1965 р. Метод ґрунтується на реакції фенольних груп із фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом у лужному середовищі з утворенням інтенсивно забарвлених продуктів – молібденової та вольфрамової сині, оптична густина яких вимірюється спектрофотометрично при 760 нм. Механізм реакції включає перенесення електрона від фенолят-аніону до гетерополікіслот з утворенням відновлених форм молібдену та вольфраму. Кількісний аналіз проводиться за

калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартної речовини, а результати виражаються у міліграмах еквівалентів стандарту на грам сухої речовини [29, 30].

У фармакопейній та науковій практиці для калібрування використовують переважно два стандарти – галову кислоту та пірогалол. Галова кислота (3,4,5-тригідроксибензойна кислота) є найпоширенішим стандартом для визначення загального вмісту фенолів у рослинних екстрактах та харчових продуктах завдяки доступності, низькій токсичності та достатній стабільності (рис. 2.1). Водночас вона характеризується відносно нижчою оптичною чутливістю порівняно з пірогалолом, що може знижувати її застосування при аналізі зразків із низьким вмістом поліфенолів [29-32].

Важливо зазначити, що вибір стандарту для калібрування безпосередньо впливає на чутливість методу та точність кількісного визначення поліфенольних сполук, особливо при аналізі зразків із низьким вмістом аналітів.

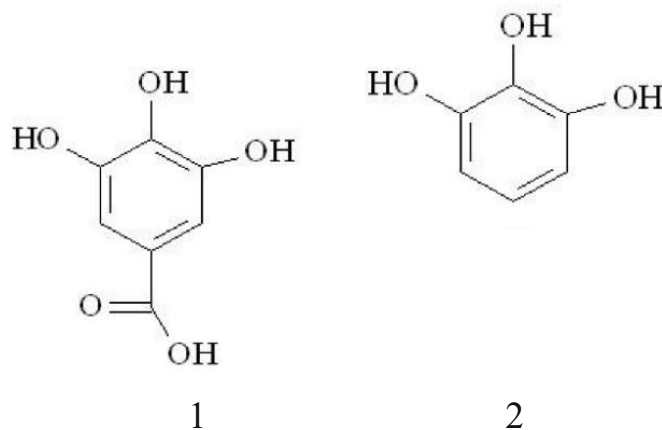


Рис. 2.1. Хімічна структура стандартних фенольних сполук – галової кислоти (1) та пірогалолу (2) [31]

Пірогалол (1,2,3-тригідроксибензен) є офіційним стандартом ЄФ для кількісного визначення танінів [33]. Його перевагою є висока абсорбційна здатність, зумовлена наявністю трьох суміжних гідроксильних груп, що

забезпечує інтенсивніше забарвлення в реакції з реактивом Фоліна–Чокальте та, відповідно, підвищену чутливість методу. Це дозволяє досягти кращого співвідношення сигнал/шум і нижчої межі кількісного визначення. Крім того, пірогалол є структурним фрагментом галлотанінів, що робить його більш релевантним стандартом для аналізу цієї групи сполук. Водночас до його недоліків належать вища токсичність (LD_{50} 300–500 мг/кг) та нестабільність у розчині, що зумовлює необхідність приготування свіжих розчинів і дотримання умов захисту від світла та кисню [32, 34].

Метод Фоліна–Чокальте зазнав численних модифікацій, спрямованих на підвищення швидкості та відтворюваності аналізу. Зокрема, заміна карбонату натрію на гідроксид натрію дозволяє скоротити час реакції з 120 хв до 3 хв без суттєвої втрати точності результатів. Сучасні підходи підкреслюють необхідність матрикс-специфічної оптимізації умов реакції (довжини хвилі, часу інкубації, концентрації реагентів, температури) для різних типів рослинної сировини [32].

Для селективного визначення саме танінів, а не всіх фенольних сполук, застосовують метод попереднього видалення танінів шляхом адсорбції на шкірному порошку. Танінові сполуки, здатні зв'язувати білки, адсорбуються, тоді як низькомолекулярні феноли залишаються у розчині. Вміст танінів визначають як різницю між загальними вмістом фенолів та вмістом неадсорбованих сполук [33].

Для точного визначення окремих маркерних компонентів, зокрема характерного для пеларгонії кумарину умкаліну, застосовують високоефективну рідинну хроматографію, поєднану з мас-спектрометрією (ВЕРХ-МС/МС). Метод передбачає розділення компонентів на колонці зі зворотною фазою (C_{18}) із використанням градієнтного елюювання водно-органічною системою (зазвичай із додаванням мурашиної кислоти) та подальше мас-спектрометричне детектування в режимах позитивної або негативної іонізації. Такий підхід забезпечує високу селективність і чутливість аналізу. Крім того, ВЕРХ–МС/МС дозволяє не

лише кількісно визначити окремі сполуки, але й досліджувати структурні особливості та ступінь полімеризації проантоціанідинів [34]. Встановлено, що вміст окремих маркерних сполук не завжди корелює із загальною біологічною активністю екстракту, що обмежує можливості такого підходу та обґрунтовує необхідність комплексної оцінки поліфенольного складу [35, 36].

Зв'язок між хімічним складом та біологічною активністю може бути оцінений за допомогою функціональних біохімічних тестів. Одним із найбільш поширених є метод із використанням катіон-радикалу 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонату) (АБТС⁺•), у якому антиоксиданти екстракту нейтралізують радикал, що супроводжується зменшенням інтенсивності забарвлення та реєструється спектрофотометрично при 734 нм. Результати виражають у відсотках інгібування або у вигляді значення ІС₅₀. Поряд із цим широко застосовують метод із радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (ДФПГ) та метод визначення ферум-відновлювальної здатності. Комбіноване використання цих тестів забезпечує більш повну характеристику антиоксидантного потенціалу, оскільки вони базуються на різних механізмах дії [38-39].

Таким чином, аналіз літературних даних свідчить, що вибір методу кількісного визначення поліфенольних сполук залежить від мети дослідження та технічних можливостей лабораторії. Колориметричний метод Фоліна–Чокальте є простим і доступним для інтегральної оцінки загального вмісту поліфенолів. ВЕРХ-МС/МС використовується для визначення специфічних маркерних сполук, зокрема умкаліну у *P. sidoides* та *P. reniforme*, проте потребує дорогого обладнання. Функціональні біохімічні методи дозволяють оцінити антиоксидантну активність екстрактів. Сукупність даних свідчить, що саме сумарний поліфенольний комплекс є ключовим показником якості поліфенолвмісної рослинної сировини.

2.2. Валідація аналітичних методів: історичні аспекти та сучасні вимоги

Валідація аналітичних методів є невід'ємною складовою забезпечення якості аналітичних досліджень і гарантує надійність, правильність та відтворюваність отриманих результатів. Її метою є надання об'єктивних доказів того, що аналітичний метод придатний для визначення цільового аналіту та забезпечує отримання достовірних і відтворюваних результатів незалежно від умов виконання, виконавця чи використовуваного обладнання. Валідація є обов'язковою вимогою при реєстрації лікарських засобів, оскільки формує основу довіри регуляторних органів до якості, безпеки та ефективності фармацевтичної продукції. Незважаючи на ресурсоємність, цей процес дозволяє запобігти суттєвим помилкам, оптимізувати виробничі процеси та забезпечити належний рівень захисту здоров'я пацієнтів [40].

Історичне становлення концепції валідації розпочалося у 1970-х роках. Ранні редакції Належної виробничої практики (НВП), хоча і не містили терміна «валідація», вже включали принципи забезпечення точності та відтворюваності лабораторних вимірювань. Важливим етапом стало офіційне впровадження поняття "валідація" у вимоги НВП у 1979 році, що передбачало необхідність документального підтвердження придатності методів. Подальша міжнародна гармонізація була досягнута завдяки настановам Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації фармацевтичних препаратів для людини (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) Q2A та Q2B, прийнятим у середині 1990-х, які стали глобальним стандартом у сфері валідації аналітичних методів. Паралельно фармакопеї, починаючи з Фармакопеї США (1995 р.), включали окремі розділи, присвячені валідації, а регуляторні органи різних галузей (зокрема Агентство з охорони навколишнього середовища) розробили власні вимоги до оцінки аналітичних методик.

У 1990-х роках значний внесок у розвиток практичних аспектів валідації зробили провідні дослідники. Зокрема, запропонував систематизований підхід до валідації з визначенням мінімально необхідних характеристик аналітичного методу. Ренгер та його колеги продемонстрували практичну реалізацію валідації на прикладі методу визначення теофіліну з використанням високоефективної тонкошарової хроматографії, що відповідало вимогам гармонізації в межах ЄС. Вегшайдер розробив підходи до оцінки калібрування, відновлення, стійкості та порівняння методів, що сприяло формуванню системного наукового підходу до валідації [40-43].

Таким чином, розвиток концепції валідації демонструє еволюцію від окремих теоретичних положень до стандартизованої практики, яка є обов'язковим етапом будь-якого аналітичного дослідження у фармацевтичній галузі.

В Україні сучасні вимоги до валідації аналітичних методів викладені в Державній Фармакопеї України (ДФУ, 2-ге видання, доповнення 7, чинне з 2024 року) [44].

Відповідно до сучасних підходів, обсяг валідаційних досліджень залежить від призначення аналітичного методу [42-44]. Виділяють такі основні типи аналітичних методик:

1. методи ідентифікації, спрямовані на підтвердження справжності аналізованої речовини шляхом порівняння її властивостей з еталоном;
2. методи кількісного визначення діючих речовин або інших компонентів у субстанціях та ЛЗ;
3. методи визначення граничного вмісту домішок;
4. методи кількісного визначення домішок.

Для кожного типу методики визначають відповідні валідаційні характеристики:

1. Специфічність — здатність методу однозначно визначати аналіт у присутності інших компонентів (домішок, продуктів розкладання, допоміжних речовин).

2. Правильність — ступінь близькості отриманих результатів до істинного або референтного значення; зазвичай оцінюється методом стандартних.

3. Прецизійність — ступінь узгодженості результатів серії вимірювань:

- збіжність — прецизійність за однакових умов (один аналітик, короткий інтервал часу);
- внутрішньолабораторна прецизійність — з урахуванням внутрішньолабораторних варіацій (різні дні, аналітики, обладнання);
- відтворюваність — прецизійність при виконанні в різних лабораторіях.

4. Межа виявлення — мінімальна кількість аналіту, яку можна виявити, але не обов'язково кількісно визначити.

5. Межа кількісного визначення — мінімальна кількість аналіту, яку можна кількісно визначити з прийнятною точністю та прецизійністю.

6. Лінійність — здатність методу забезпечувати результати, прямо пропорційні концентрації аналіту у визначеному діапазоні.

7. Діапазон застосування — інтервал концентрацій, у межах якого доведено лінійність, правильність та прецизійність (наприклад, 80–120% від номінального вмісту для кількісних методів).

8. Робастність — стійкість методу до незначних варіацій умов проведення аналізу (рН, температура, склад елюенту тощо) [42-44].

Обсяг дослідження зазначених характеристик визначається типом аналітичного методу та його призначенням. Сучасні фармакопеї, включаючи ДФУ, надають детальні рекомендації щодо валідації методів, таких як УФ-спектрофотометрія, атомно-абсорбційна спектрометрія, тонкошарова та рідинна хроматографія [44].

Отже, валідація аналітичних методів трансформувалася з окремого етапу перевірки у системний процес, що охоплює весь життєвий цикл аналітичної методики. Вона є ключовим елементом системи забезпечення якості та гарантує отримання достовірних даних, необхідних для прийняття

обґрунтованих рішень на всіх етапах життєвого циклу лікарського засобу — від розробки до регуляторного контролю.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Реактиви та матеріали

Об'єктом дослідження була методика «Кількісного визначення» ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг) серії 0079747, виробництва компанії «Arterium» (Україна).

Діючою речовиною ЛЗ був сухий екстракт коренів пелагонії (50% нативний екстракт, DER 4-7:1). Допоміжні речовини: мікросталічна целюлоза (48%) та кремній діоксид (2%). Вміст сухого екстракту коренів пелагонії в одній таблетці становив від 18,0 до 22,0 мг упродовж терміну зберігання. Вміст танінів у перерахунку на пірогалол становив від 2,0 до 10,0 мг на таблетку.

У роботі було використано такі реактиви та метаріали:

1. сухий екстракт коренів пелагонії, серія, використана для виробництва ЛЗ, «Галичфарм» (Україна);
2. фосфорно-молібденово-вольфрамовий реактив, серія ВССК8300, термін придатності до 31.08.2027, «Sigma-Aldrich» (США);
3. натрію карбонат безводний, серія 30.3060903, термін придатності до 31.03.2027, «Sigma-Aldrich» (США);
4. пірогалол, серія ВССК7477, термін придатності до 30.09.2028, «Sigma-Aldrich» (США).

Фармакопейні реактиви, включаючи воду очищену, відповідали вимогам ДФУ, інші реактиви мали кваліфікацію не нижче «ч.д.а.» та використовувалися без додаткового очищення.

Обладнання, використане у роботі: аналітичні ваги Mettler Toledo XSE205DU/M, водяна баня з вбудованим шейкером DAIHAN Scientific WSB-

18, спектрофотометр Shimadzu UV-1800 240V IVD, рідинний хроматограф Shimadzu Nexera LC30-AD.

3.2. Методика кількісного визначення для контролю якості лікарського засобу «Резістол[®]-Таб» (методика 1)

Випробування проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовому й видимому діапазоні відповідно до вимог ДФУ [45].

Середню масу таблетки визначають згідно з методикою «Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу», описаною в ДФУ [46]. Операції екстрагування та приготування розчинів здійснювали у захищеному від світла місці.

Випробуваний розчин 1. 400 мг сухого екстракту коренів пеларгонії (партії використаної для виробництва досліджуваної серії ЛЗ) поміщали у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води і нагрівали на водяній бані за температури 90°C протягом 1 год. Після охолодження під струменем проточної води розчин кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250,0 мл. Круглодонну колбу ополіскували водою, промивні води переносили в мірну колбу та доводили об'єм розчину водою до 250,0 мл. Після відстоювання осаду розчин відфільтрували через фільтрувальний папір «Біла стрічка», відкидаючи перші 50 мл фільтрату. 5,0 мл отриманого фільтрату доводили водою до 25,0 мл. До 2,0 мл одержаного розчину додавали 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та 10,0 мл води, після чого доводили об'єм розчину 290 г/л розчином натрію карбонату до 25,0 мл.

Випробуваний розчин 2. 4000 мг порошку розтертих таблеток, попередньо звільнених від оболонки, поміщали у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води і нагрівали на водяній бані за температури 90°C протягом 1 год, охолоджують під проточною водою та

кількісно переносять у мірну колбу місткість 250,0 мл. Подальшу обробку здійснюють аналогічно до випробуваного розчину 1.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50 мг пірогалолу розчиняли у воді та доводили об'єм розчину до 100,0 мл тим самим розчинником. 5,0 мл отриманого розчину доводили водою до об'єму 100,0 мл. До 2,0 мл одержаного розчину додавали 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та 10,0 мл води, після чого доводили об'єм розчину 290 г/л розчином натрію карбонату до 25,0 мл. Через 40 хв після приготування вимірювали оптичну густину (ОГ) випробуваних розчинів та розчину порівняння за довжини хвилі 760 нм, використовуючи воду у якості компенсаційного розчину. Вміст танінів (X_1) в сухому екстракті коренів пеларгонії, % (у перерахунку на піроганол), розраховували за формулою:

$$X_1 = \frac{62,5 \cdot A_i \cdot m_0 \cdot P}{A_0 \cdot m_i \cdot 100}, \quad (3.1)$$

де A_i – оптична густина випробуваного розчину 1;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_0 – маса наважки пірогалолу, мг;

m_i – маса наважки випробуваного розчину 1, мг;

P – вміст пірогалолу, %.

Вміст танінів (X_2) в одній таблетці, мг:

$$X_2 = \frac{62,5 \cdot A_i \cdot m_0 \cdot P \cdot b}{A_0 \cdot m_i \cdot 10000}, \quad (3.2)$$

де A_i – оптична густина випробуваного розчину 2;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_0 – маса наважки пірогалолу, мг;

m_i – маса наважки випробуваного розчину, мг;

P – вміст пірогалолу, %;

b – середня маса таблетки без оболонки, мг.

Вміст танінів в одній таблетці (у перерахунку на пірогалол) мав становити 2,0-10,0 мг.

Вміст сухого екстракту пеларгонії коренів (X_3) в одній таблетці, мг:

$$X_3 = \frac{X_2 \cdot 100}{X_1 \cdot 2}, \quad (3.3)$$

Вміст сухого екстракту пеларгонії коренів (X_3) в одній таблетці мав становити 18,0-22,0 мг протягом терміну зберігання [33, 44].

3.3. Підготовка зразків для валідації

3.3.1. Підготовка зразків для оцінювання специфічності (випробування № 1)

1. *Розчин порівняння.* Готували відповідно до Методики 1.

2. *Розчин плацебо.* Готували суміш плацебо, яка містила всі компоненти ядра таблетки, за винятком аналіту.

3600 мг суміші плацебо поміщали у круглodonну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води та нагрівали на водяній бані за температури 90°C протягом 1 год. Після охолодження під струменем холодної проточної води розчин кількісно переносили у мірну колбу місткість 250,0 мл. Круглodonну колбу ополіскували водою, промивні води переносили в мірну

колбу та доводили об'єм розчину водою до позначки. Після відстоювання осаду розчин фільтрували через фільтрувальний папір «Біла стрічка», відкидаючи перші 50 мл фільтрату. 5,0 мл отриманого фільтрату доводили водою до об'єму 25,0 мл. До 2,0 мл одержаного розчину додавали 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та 10,0 мл води, після чого доводили об'єм розчину 290 г/л розчином натрію карбонату до 25,0 мл.

3. *Модельний розчин.* 3600 мг суміші плацебо та 400 мг сухого екстракту коренів пеларгонії поміщали у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води і нагрівали на водяній бані за температури 90°C протягом 1 год. Подальшу обробку проводили аналогічно до розчину плацебо.

Через 40 хв після приготування вимірювали оптичну густину розчину плацебо, модельного розчину та розчину порівняння на довжині хвилі 760 нм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

3.3.2. Підготовка зразків для оцінювання лінійності (випробування № 2)

1. *Розчин порівняння.* Готували відповідно до методики 1.

2. *Модельні розчини.* У круглодонну колбу місткістю 250 мл поміщали наважки сухого екстракту коренів пеларгонії та плацебо відповідно до табл. 3.1, додавали 150 мл води і нагрівали на водяній бані за температури 90°C протягом 1 год. Після охолодження під проточною водою розчин кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250,0 мл. Круглодонну колбу ополіскували водою, промивні води переносили в мірну колбу і доводили об'єм розчину водою до позначки. Після відстоювання осаду розчини відфільтрували через фільтрувальний папір «Біла стрічка», відкидаючи перші 50 мл фільтрату. 5,0 мл отриманого фільтрату доводили водою до об'єму 25,0 мл. До 2,0 мл одержаного розчину додавали 1,0 мл

фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та 10,0 мл води, після чого доводили об'єм розчину 290 г/л розчином натрію карбонату до 25,0 мл.

Через 40 хв після приготування вимірювали оптичну густину розчину порівняння та модельних розчинів при довжині хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

Таблиця 3.1

Склад модельних розчинів для оцінювання лінійності методики

№ модельного розчину	Вміст, %	Наважка екстракту, мг	Наважка плацебо, мг
1	20	80	720
2	40	160	1440
3	60	240	2160
4	80	320	2880
5	100	400	3600
6	120	480	4320
7	140	560	5040
8	160	640	5760
9	180	720	6480

**3.3.3. Підготовка зразків для оцінювання правильності
(випробування № 3)**

1. *Розчин порівняння.* Готували відповідно до методики 1.

2. *Модельні розчини.* У круглодонну колбу місткістю 250 мл поміщали наважки сухого екстракту пеларгонії коренів та плацебо відповідно до табл. 3.2, додавали 150 мл води і нагрівали на водяній бані за

температури 90°C протягом 1 год. Після охолодження під проточною водою розчин кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250,0 мл. Круглодонну колбу ополіскували водою, промивні води переносили в мірну колбу і доводили об'єм розчину водою до позначки. Після відстоювання осаду розчини фільтрували через фільтрувальний папір «Біла стрічка», відкидаючи перші 50 мл фільтрату. 5,0 мл отриманого фільтрату доводили водою до об'єму 25,0 мл. До 2,0 мл одержаного розчину додавали 1,0 мл фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та 10,0 мл води, після чого доводили об'єм розчину 290 г/л розчином натрію карбонату до 25,0 мл.

Таблиця 3.2

Склад модельних розчинів для оцінювання правильності методики

№ модельного розчину	Вміст, %	Наважка екстракту, мг	Наважка плацебо, мг
1	20	80	720
2	100	400	3600
3	180	720	6480

Через 40 хв після приготування вимірювали оптичну густину розчину порівняння та модельних розчинів при довжині хвилі 760 нм в кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

3.4. Статистична обробка результатів

Отримані результати аналізували за допомогою методів варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel (версія 2019).

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Результати розробки аналітичної методики

Контроль якості ЛЗ на основі рослинних екстрактів потребує застосування надійних та валідованих аналітичних методик, які забезпечують значущість отриманих результатів. У випадку препаратів на основі екстрактів коренів *Pelargonium sidoides* DC та *pelargonium reniforme* стандартизація аналітичних підходів є важливим критерієм відповідності фармакопейним вимогам [33, 44].

У зв'язку з цим у даному дослідженні було розроблено та валідовано методику кількісного визначення діючої речовини – сухого екстракту коренів пеларгонії, для контролю якості ЛЗ «Резістол[®]-Таб» шляхом визначення вмісту танінів із подальшим перерахунком на вміст діючої речовини.

4.1.1. Визначення оптимального часу екстрагування випробуваних розчинів

Згідно з розробленою методикою, пробопідготовка передбачала нагрівання наважки субстанції та порошку подрібнених таблеток на водяній бані за температури 90°C. З метою встановлення мінімального достатнього часу, що забезпечує повноту вилучення танінів, було проведено серію експериментів із тривалістю екстрагування 30, 60, 90 та 120 хв. Кожен зразок аналізували відповідно до описаної методики з вимірюванням ОГ при довжині хвилі 760 нм. Вміст танінів розраховували у відсотках у перерахунку на пірогалол. Отримані результати наведено на рис. 4.1.

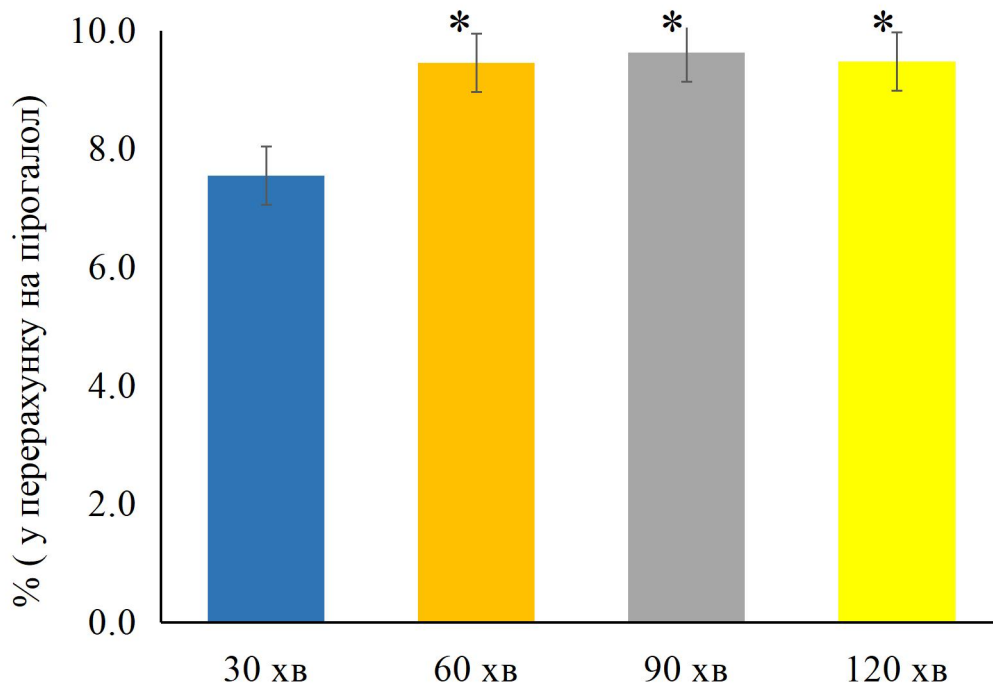


Рис. 4.1. Вміст танінів у сухому екстракті коренів пелагонії за різної тривалості екстрагування ($M \pm SD$, $n = 3$)

* $p < 0,05$ – статистично значуща різниця порівняно зі зразком після 30 хв екстрагування

Як видно з наведених даних, збільшення часу екстрагування з 30 до 60 хв супроводжувалося істотним збільшенням вмісту танінів, що свідчило про неповноту їх вилучення за тривалості екстрагування 30 хв. Подальше збільшення часу екстрагування до 90 хв зумовлювало лише незначне підвищення показника. При екстрагуванні протягом 120 хв спостерігалося незначне зниження вмісту танінів, що, ймовірно, було пов'язано з частковою деструкцією або окисненням фенольних сполук за умов тривалого нагрівання.

Таким чином, оптимальним часом екстрагування було встановлено 60 хв, оскільки за цих умов забезпечувалося практично повне вилучення танінів, тоді як подальше збільшення тривалості процесу не супроводжувалося значущим підвищенням їх виходу та могло приводити до деградації сполук.

Отже, у подальших дослідженнях, включаючи валідацію методики та аналіз ЛЗ «Резістол®-Таб», використовували тривалість екстрагування 60 хв.

4.1.2. Дослідження кінетики реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом

Згідно з вимогами ДФУ, перед вимірюванням ОГ розчини необхідно витримувати протягом 30 хв після додавання фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву та розчину натрію карбонату [44]. Однак для підтвердження достатності цього часу та виключення можливих похибок, пов'язаних із неповним перебігом реакції, було проведено дослідження кінетики утворення забарвленого продукту. ОГ вимірювали при довжині хвилі 760 нм одразу після приготування розчину порівняння та надалі кожні 5 хв протягом 55 хв. Отримані результати наведено на рисунку 4.2. у вигляді графіка залежності ОГ від часу.

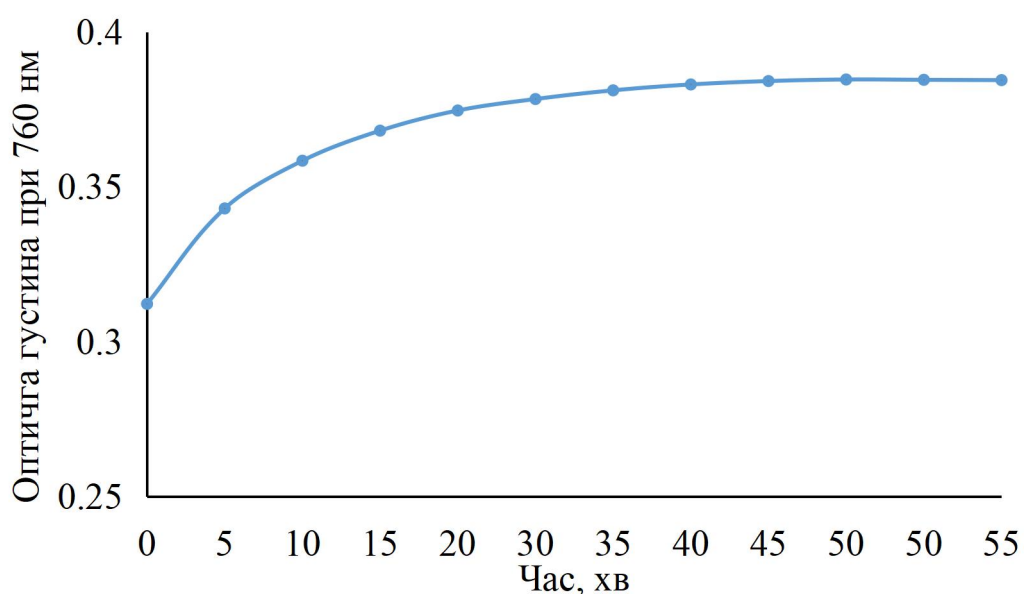


Рис. 4.2. Залежність оптичної густини розчину порівняння від тривалості реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом

Як видно з наведених даних, одразу після приготування розчину ОГ становила близько 0,31, що свідчило про активний перебіг реакції вже на початковому етапі. Подальше зростання показника поступово

сповільнювалося і тривало до 40-ї хв. У часовому інтервалі 40-55 хв зміна ОГ була мінімальною: різниця між значеннями на 40-й та 55-й хвилині становила менше 0,002, а відносне відхилення не перевищувало 0,5%. Це свідчило про досягнення реакцією стаціонарного стану та вихід кривої на плато.

Таким чином, було встановлено, що реакція практично завершується через 40 хв після приготування розчинів. Незважаючи на те, що ДФУ рекомендує час витримання 30 хв, отримані результати свідчать про доцільність збільшення цього інтервалу до 40 хв для забезпечення повної стабілізації забарвлення [44]. Тому в подальших дослідженнях, включаючи валідацію методики, було обрано час витримання 40 хв, що забезпечувало підвищення точності та відтворюваності результатів.

4.2. Результати валідації аналітичної методики

Метою валідаційних досліджень було підтвердження того, що запропонована методика забезпечує отримання значущих і відтворюваних результатів та може бути застосована для контролю показника «Кількісне визначення» ЛЗ «Резістол[®]-Таб».

Об'єктом валідації була розроблена аналітична методика (методика 1). Згідно з вимогами ДФУ та загальноприйнятою класифікацією, дана методика належить до методик типу 2 – методик кількісного визначення. Для методик цього типу обов'язковому оцінюванню підлягають такі валідаційні характеристики: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність (збіжність), внутрішньолабораторна прецизійність та робасність (стабільність розчинів) [44].

Першим завданням валідації було визначення максимально допустимої невизначеності результатів аналізу ($\max\Delta_{As}$), а також розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}) та сумарної невизначеності аналізу.

Згідно з [44], максимально допустима невизначеність для методик даного типу визначається за формулою:

$$\max\Delta_{As} \leq 0,32 \cdot \frac{(B_{B.M} - B_{H.M})}{2}, \quad (4.1)$$

де $B_{B.M}$ – верхня межа вмісту за специфікацією, у відсотках від номінального вмісту;

$B_{H.M}$ – нижня межа вмісту за специфікацією, у відсотках від номінального вмісту.

Для ЛЗ «Резістол[®]-Таб» вміст танінів у таблетці становить 2,0-10,0 мг (у перерахунку на пірогалол), при цьому номінальне значення становить 6 мг. Таким чином, нижня межа специфікації (2,0 мг) відповідає 33,3%, а верхня (10,0 мг) – 166,7% від номінального значення.

$$\max\Delta_{As} \leq 0,32 \cdot \frac{(166,7\% - 33,3\%)}{2} \leq 21,34\%, \quad (4.2)$$

Наступним етапом роботи було визначення невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}), характеризує сумарний внесок похибок окремих операцій (зважування, відмірювання об'ємів тощо):

$$\Delta_{sp} = \sqrt{\sum_i \Delta_i^2}, \quad (4.3)$$

де Δ_i – невизначеність окремої операції пробопідготовки.

Для забезпечення придатності методики має виконуватися умова:

$$\Delta_{sp} \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As} \quad (4.4)$$

Підставляючи значення $\max \Delta_{As} = 21,34\%$, отримуємо:

$$\Delta_{sp} \leq 0,32 \cdot 21,34 \leq 6,83\% \quad (4.5)$$

Таким чином, розрахунок невизначеності дозволив обґрунтовано підтвердити, що методика контролю показника «Кількісне визначення» ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг) відповідає своєму призначенню.

Результати розрахунку невизначеності пробопідготовки для розчинів методики 1 наведено в табл. 4.1-4.3.

Таблиця 4.1

Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}) для розчину порівняння

Операція пробопідготовки	Параметри	Невизначеність, %
Взяття наважки пірогалолу	50,0 мг	$0,2 / 50,0 \cdot 100 = 0,4$
Доведення до об'єму (мірна колба)	100,0 мл	$0,12 \cdot 2 = 0,24$
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	5,0 мл	0,22
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	2,0 мл	0,37
Доведення до об'єму (мірна колба)	25,0 мл	0,140
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	1,0 мл	0,6
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	10,0 мл	0,152

Сумарну невизначеність пробопідготовки визначали шляхом квадратичного підсумовування:

$$\Delta_{sp}(\text{розч.пор}) = \sqrt{0,4^2 + 0,24^2 + 0,22^2 + 0,37^2 + 0,140^2 + 0,6^2 + 0,152^2} = 0,90\% \quad (4.6)$$

Таблиця 4.2

Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}) для випробуваного розчину 1

Операція пробопідготовки	Параметри	Невизначеність, %
Взяття наважки сухого екстракту коренів пеларгонії	400,0 мг	$0,2 / 400,0 \cdot 100 = 0,05$
Доведення до об'єму (мірна колба)	250,0 мл	0,049
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	5,0 мл	0,22
Доведення до об'єму (мірна колба)	25,0 мл	$0,140 \cdot 2 = 0,280$
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	2,0 мл	0,37
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	1,0 мл	0,6
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	10,0 мл	0,152

Сумарна невизначеність пробопідготовки для випробуваного розчину 1 становила:

$$\Delta_{sp}(\text{випр.1 р}) = \sqrt{0,05^2 + 0,49^2 + 0,22^2 + 0,280^2 + 0,37^2 + 0,6^2 + 0,152^2} = 0,81\% \quad (4.7)$$

Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}) для випробуваного розчину 2

Операція пробопідготовки	Параметри	Невизначеність, %
Взяття наважки порошку розтертих таблеток	4000,0 мг	$0,2 / 4000,0 \cdot 100 = 0,005$
Доведення до об'єму (мірна колба)	250,0 мл	0,049
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	5,0 мл	0,22
Доведення до об'єму (мірна колба)	25,0 мл	$0,140 \cdot 2 = 0,280$
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	2,0 мл	0,37
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	1,0 мл	0,6
Взяття аліквоти (піпетка Мора)	10,0 мл	0,152

$$\Delta_{sp \text{ (випр.2 р)}} = \sqrt{0,005^2 + 0,49^2 + 0,22^2 + 0,280^2 + 0,37^2 + 0,6^2 + 0,152^2} = 0,81\% \quad (4.8)$$

Оскільки всі три розчини були складовими єдиної аналітичної процедури, сумарну невизначеність пробопідготовки методики розраховували шляхом квадратичного підсумовування невизначеностей кожного розчину. На основі цих даних було розраховано сумарну невизначеність пробопідготовки методики як:

$$\Delta_{sp} = \sqrt{\Delta_{sp \text{ (розч.пор)}}^2 + \Delta_{sp \text{ (випр.1 р)}}^2 + \Delta_{sp \text{ (випр.2 р)}}^2} \quad (4.9)$$

Підставивши раніше визначені значення Δ_{sp} (розч.пор), Δ_{sp} (випр.1 р) та Δ_{sp} (випр.2 р), отримали $\Delta_{sp} = 1,45\%$.

Показано, що отримане значення не перевищувало допустимого критерію ($\Delta_{sp} \leq 6,83\%$), що свідчило про відповідність вимогам до невизначеності пробопідготовки. Оскільки сумарна невизначеність пробопідготовки була незначною порівняно з максимально допустимою невизначеністю, подальший розрахунок повної невизначеності аналізу не був необхідним.

Таким чином, методика була метрологічно коректною та могла бути валідована. У зв'язку з цим було проведено оцінювання таких валідаційних характеристик: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність (збіжність), внутрішньолабораторна прецизійність та робасність (стабільність розчинів).

Згідно з [44], діапазон застосування методики 1 мав становити не менше 20% — 180% від номінального вмісту аналіту у випробуваному розчині.

4.2.1. Оцінювання специфічності аналітичної методики

Специфічність аналітичної методики передбачає відсутність або незначущість впливу компонентів матриці зразка (плацебо) на результат аналізу.

При спектрофотометричному визначенні аналітичним сигналом було значення ОГ при певній довжині хвилі, тому вплив ОГ плацебо на значення ОГ досліджуваного зразка мав бути незначним відносно максимально допустимої невизначеності результату аналізу ($\max \Delta_{As}$) [42, 46].

ОГ плацебо (A_0) повинна повинна була бути незначною відносно ОГ розчину порівняння (A_{RS}):

$$\varepsilon \leq \frac{A_0}{A_{RS}} \cdot 100\% \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As}, \quad (4.10)$$

де ε – відносне відхилення оптичної густини плацебо від розчину порівняння;

A_{RS} – оптична густина розчину порівняння;

A_0 – оптична густина розчину плацебо.

З урахуванням раніше розрахованого значення $\max \Delta_{As} = 21,34\%$ отримали граничне значення:

$$\varepsilon \leq 0,32 \cdot 21,34 \leq 6,83\% \quad (4.11)$$

Крім того, для ідентифікації аналіту у спектрі модельного розчину мав бути наявний максимум поглинання, а довжина хвилі максимуму поглинання модельного розчину (λ_{\max}^M) не повинна була відрізнялася від відповідного значення для стандартного зразка (λ_{\max}^0) більш ніж на 2 нм, якщо інше не вказано в методиці 1:

$$\Delta\lambda \leq |\lambda_{\max}^M - \lambda_{\max}^0| \leq 2 \text{ нм}, \quad (4.12)$$

Для підтвердження специфічності методики готували розчин плацебо (суміш усіх компонентів таблетки без діючої речовини), модельний розчин та розчин порівняння. Через 40 хв після приготування вимірювали ОГ при довжині хвилі 760 нм, використовуючи воду як компенсаційний розчин. За результатами вимірювань розраховували відносне відхилення ε .

Отримані результати показали, що ОГ плацебо була незначущою відносно розчину порівняння ($\varepsilon = 0,64\%$), що було менше за граничне значення (6,83%). Це свідчило про відсутність значущого впливу компонентів матриці плацебо на результат аналізу.

Додатково оцінювали положення максимуму поглинання модельного

розчину, яке повинно було відповідати значенню 760 ± 2 нм. Спектри поглинання модельного розчину та розчину порівняння наведено на рисунку 4.3.

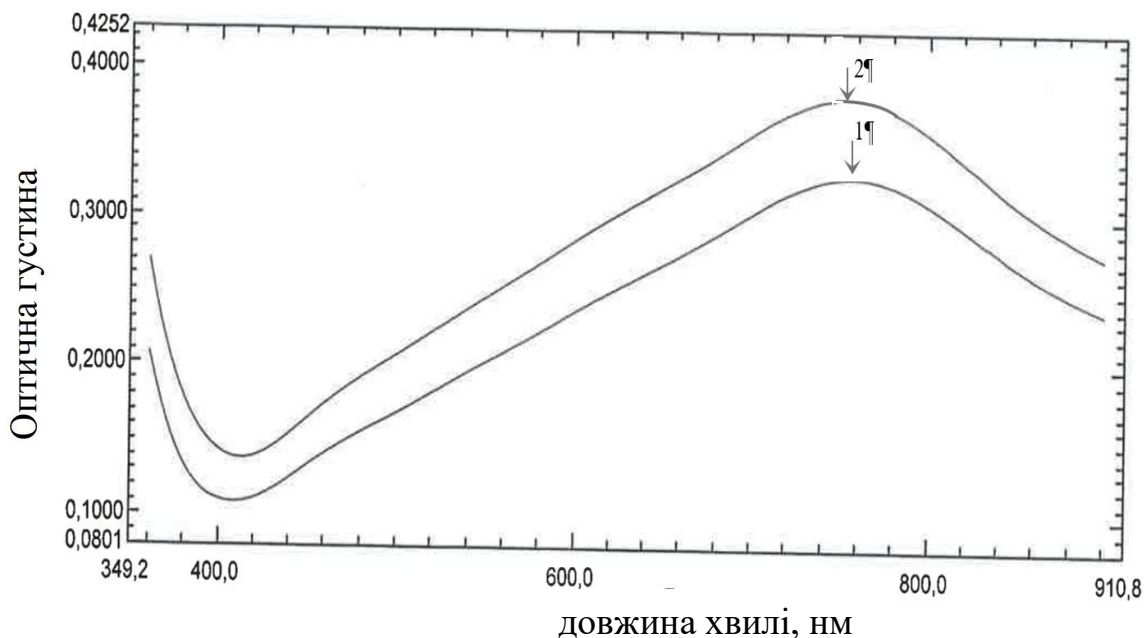


Рис. 4.3. Спектри поглинання модельного розчину (1) та розчину порівняння (2)

У спектрі модельного розчину область максимального поглинання спостерігалася при довжині хвилі 755,0 нм, що відповідало відхиленню $\Delta\lambda = 5,0$ нм від аналітичної довжини хвилі 760 нм.

Слід зазначити, що чітко виражений максимум поглинання у спектрі модельного розчину не спостерігався, а пік мав вигляд плеча. Така особливість є характерною для рослинних екстрактів, які містять складну суміш поліфенольних сполук (таніни, флавоноїдів, фенольних кислот), спектри поглинання яких накладаються один на одного, утворюючи широкі смуги без чітко виражених максимумів.

Крім того, фармакопейні методики спектрофотометричного аналізу рослинної сировини часто допускають ідентифікацію за формою спектральної кривої та положенням плеча, особливо у випадках, коли

вимірювання проводять при фіксованій довжині хвилі 760 нм після проведення кольорової реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом. За таких умов аналітичний сигнал зумовлений утворенням забарвленого комплексу фенольних сполук, а кількісне визначення проводять відносно стандартної речовини – пірогалолу.

Отже, відсутність чітко вираженого максимуму поглинання та відхилення довжини хвилі на 5,0 нм не мали суттєвого впливу на результати кількісного визначення і могли вважатися прийнятними для даного типу аналізу.

4.2.2. Оцінювання лінійності аналітичної методики

Лінійність аналітичної методики визначали як її здатність забезпечувати результати, прямо пропорційні концентрації аналізованої речовини в досліджуваному зразку в межах встановленого діапазону. Оскільки розроблена методика базувалася на використанні стандартного розчину пірогалолу, очікувалася наявність лінійної прямо пропорційної залежності між концентрації танінів у розчині та значенням ОГ [42-44].

Для оцінки лінійності готували модельні розчини в діапазоні 20–180% від номінальної концентрації танінів, а також розчин порівняння, описані в розділі 3.3.2. Через 40 хв після приготування вимірювали ОГ при довжині хвилі 760 нм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

Усі вимірювання проводили в нормалізованих координатах, що дозволяло стандартизувати критерії прийнятності незалежно від абсолютних значень концентрацій.

Згідно з вимогами ДФУ [44], нормалізовані координати розраховували за формулами:

$$X_i = \frac{C_i}{C_0} \cdot 100\%, \quad (4.13)$$

де C_i - концентрація i -ого модельного розчину;
 C_0 - концентрація розчину порівняння.

$$Y_i = \frac{A_i}{A_0} \cdot 100\%, \quad (4.14)$$

де A_0 – відносна оптична густина розчину порівняння;
 A_i – відносна оптична густина i -ого модельного розчину.

Для кожної точки отримували нормалізовані величини X_i та Y_i , після чого описували залежність між координатами у вигляді лінійної функції:

$$Y = a + b \cdot X, \quad (4.15)$$

де a – вільний член;
 b – кутовий коефіцієнт.

Ступінь лінійності оцінювали за допомогою коефіцієнта кореляції R , який прзраховували за формулою:

$$R = \sqrt{1 - \left(\frac{s_0}{s_y}\right)^2}, \quad (4.16)$$

де s_0 – залишкове стандартне відхилення нормалізованих ординат Y_i навколо середнього значення \bar{Y} ;
 s_y – стандартне відхилення нормалізованих абсцис X_i навколо середнього значення \bar{X} .

Відповідно до вимог ДФУ [44] вільний член a не повинен бути статистично значущим:

$$|a| = \frac{0,32 \cdot \max \Delta_{As}}{1 - \frac{X_{min}}{100}}, \quad (4.17)$$

де $X_{min} = 20\%$ – нижня межа досліджуваного діапазону застосування;
 $\max \Delta_{As} = 21,24\%$ – максимально припустима невизначеність результату аналізу.

Коефіцієнт лінійної кореляції R мав бути не меншим за мінімально допустиме значення R_{min} , яке визначали з урахуванням максимально допустимої невизначеності:

$$R = \sqrt{1 - \left(\frac{\max \Delta_{As}}{s_{y,t}} \right)^2}, \quad (4.18)$$

де t – одnobічний коефіцієнт Стьюдента для довірчої імовірності 95% та числа ступенів свободи $n-2$.

На основі експериментальних даних було побудовано калібрувальний графік залежності приведенного аналітичного сигналу (Y_i) від приведенної концентрації (X_i) (рис. 4.4).

Параметри лінійної регресії, розраховані методом найменших квадратів, становили: коефіцієнт кореляції $R = 0,9993$, мінімально допустиме значення $R_{min} = 0,9825$, кутовий коефіцієнт $b = 0,9625$, вільний член $a = 3,68\%$. Отримане значення коефіцієнта кореляції відповідало встановленому критерію прийнятності ($R \geq R_{min}$). Розраховане граничне значення для вільного члена становило $|a| \leq 8,54\%$, тоді як експериментальне значення $|a| = 3,68\%$, не перевищувало цієї межі, що свідчило про відсутність статистично значущої систематичної похибки.

Таким чином, у досліджуваному діапазоні концентрацій (20%–180% від номінального значення) між приведеною концентрацією аналіту та

приведеним аналітичним сигналом спостерігалася лінійна залежність, що підтверджувало відповідність методики вимогам ДФУ щодо лінійності.

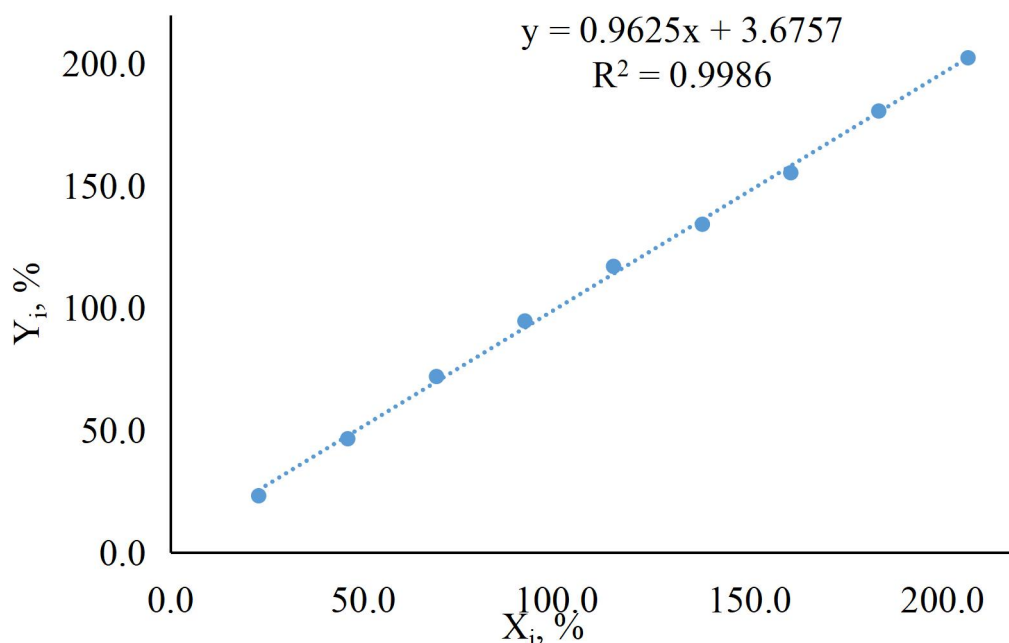


Рис. 4.4. Залежність приведенного аналітичного сигналу (Y_i) від приведенної концентрації (X_i)

4.2.3. Оцінювання правильності аналітичної методики

Правильність аналітичної методики характеризувала ступінь відповідності між істинним (прийнятим референтним) значенням та значенням, отриманим за допомогою цієї методики. Для методик кількісного визначення готових лікарських засобів (ГЛЗ) правильність підтверджувалася відсутністю статистично значущої систематичної похибки результатів [42-44].

Оцінювання правильності проводили шляхом аналізу модельних розчинів на трьох рівнях концентрації: 20%, 100% та 180% від номінального вмісту аналіту. Для кожного рівня готували по три паралельні зразки.

Модельні розчини готували та аналізували відповідно до методики, описаної в розділі 3.3.3.

За результатами вимірювань розраховували ступінь вилучення (Z_i):

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%, \quad (4.19)$$

де X_i — приведена концентрація аналіту, мг/мл;

Y_i — приведений аналітичний сигнал

Значення X_i та Y_i визначали відповідно до формул 4.13 та 4.14. Систематичну похибку методики δ розраховували як відхилення середнього значення ступеня вилучення від 100%:

$$\delta = |Z_i - 100\%|, \quad (4.20)$$

Відповідно до встановлених критеріїв прийнятності ГЛЗ систематична похибка не повинна перевищувати граничне значення:

$$\delta \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As}, \quad (4.21)$$

Підставляючи раніше розраховане значення $\max \Delta_{As} = 21,34\%$, отримували граничне значення $\delta \leq 6,83\%$.

Результати розрахунку ступеня вилучення (Z_i), середніх значень (\bar{Z}_i) та систематичної похибки для кожного рівня концентрації наведено в табл. 4.4.

За отриманими результатами встановлено, що значення систематичної похибки δ для всіх рівнів концентрації не перевищували допустимого критерію ($\delta \leq 6,83\%$), а середні значення ступеня вилучення для всіх досліджуваних рівнів концентрації були близькими до 100%.

Таблиця 4.4

Оцінювання правильності аналітичної методики (n = 3)

Рівень концентрації, %	n	X_i , %	Y_i , %	Z_i , %	\bar{Z}_i , %	δ , %
20	1	22,67	22,63	99,82	99,72	0,28
	2	22,70	22,60	99,56		
	3	22,59	22,54	99,79		
100	1	113,05	116,44	102,99	103,07	3,07
	2	112,89	116,40	103,14		
	3	112,97	116,45	103,08		
180	1	203,29	197,13	96,97	96,79	3,21
	2	203,38	196,66	96,70		
	3	203,24	196,53	96,70		

Таким чином, систематична похибка методики була незначущою, що підтверджувало її правильність у досліджуваному діапазоні концентрацій. Методика вважалася правильною та придатною для кількісного визначення танінів у ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг).

4.2.4. Оцінювання збіжності аналітичної методики

Збіжність аналітичної методики характеризувала точність результатів при виконанні аналізу в однакових умовах протягом короткого проміжку часу.

Для методик кількісного визначення збіжність підтверджувалася незначущістю випадкової похибки результатів, яку оцінювали за довірчим інтервалом одиничного значення вибірки ступенів вилучення (Δ_Z) [42, 46].

Для оцінювання збіжності використовували результати аналізу модельних розчинів на трьох рівнях концентрації: 20%, 100% та 180% від номінального вмісту аналіту (по три паралельні визначення для кожного рівня, $n = 3$). Дані для оцінювання збіжності отримували з тих самих експериментальних вимірювань, що й для оцінювання правильності. Ступінь вилучення (Z_i) розраховували за формулою 4.21 (табл. 4.4).

Випадкову похибку методики оцінювали за довірчим інтервалом одиничного значення вибірки:

$$\Delta_Z = s_z \cdot t, \quad (4.22)$$

де s_z – стандартне відхилення ступенів вилучення для паралельних визначень; t – одnobічний коефіцієнт Стьюдента для довірчої імовірності 95% та числа ступенів свободи $n-1$ (при $n = 3$ коефіцієнт Стьюдента становить 2,92).

Відповідно до вимог ДФУ, значення Δ_Z не повинно перевищувати максимально допустимую невизначеність результату аналізу ($\max \Delta_{As}$):

$$\Delta_Z \leq \max \Delta_{As}, \quad (4.23)$$

Підставляючи раніше розраховане значення $\max \Delta_{As} = 21,34\%$, отримували допустимий критерій: $\Delta_Z \leq 21,34\%$.

Результати розрахунку Δ_Z для трьох рівнів концентрації наведено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Оцінювання збіжності аналітичної методики (n = 3)

Рівень концентрації, %	Δ_Z, %
20	0,41
100	0,21
180	0,46

Як видно з наведених даних, значення Δ_Z для всіх досліджуваних концентрацій були значно меншими за допустимий поріг, що свідчило про незначущість випадкової похибки. Найбільше значення $\Delta_Z = 0,46\%$ спостерігається при концентрації 180%, однак воно залишалось значно нижчим за максимально допустиму невизначеність.

Таким чином, методика характеризувалася високою збіжністю та могла вважатися придатною для кількісного визначення танінів у досліджуваному діапазоні концентрацій.

4.2.5. Оцінювання внутрішньолабораторної прецизійності аналітичної методики

Внутрішньолабораторна прецизійність (ВЛП) характеризувала вплив внутрішньолабораторних варіацій (різні дні, різні аналітики, різне обладнання) на результати аналізу, отримані за однією методикою в межах однієї лабораторії. Для методик кількісного визначення ВЛП є обов'язковою

валідаційною характеристикою, оскільки вона відображає стабільність методики при зміні умов проведення аналізу [42-44].

Для підтвердження ВЛП аналізували п'ять зразків ($n = 5$) однієї серії ЛЗ протягом трьох різних діб ($m = 3$). Дослідження виконували різні аналітики. Для кожного зразка готували по 5 випробуваних розчинів 2 відповідно до методики 1, а також розчин порівняння та випробуваний розчин 1. ОГ розчинів вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 760 нм у кюветі товщиною шару 10 мм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

За результатами вимірювань для кожного зразка розраховували вміст сухого екстракту коренів пеларгонії в одній таблетці (X_z , мг) за формулою 3.3. Отримані результати наведено у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Оцінювання внутрішньолабораторної прецизійності (вміст сухого екстракту кореня пеларгонії в одній таблетці, мг)

Доба	Зразок				
	1	2	3	4	5
1	19,5	19,7	19,7	19,6	19,5
2	19,5	19,7	19,7	19,6	19,5
3	19,7	19,6	19,7	19,8	19,7
Z_{intra} , мг	19,7				
$SD_{z\text{-intra}}$, %	0,0990				
Δ_{intra} , %	0,17				

Для оцінювання ВЛП усі отримані результати (Z_i) повинні були належати до однієї генеральній сукупності, тобто бути статистично однорідними. Для цього розраховували об'єднане середнє значення (Z_{intra}), стандартне відхилення ($SD_{Z_{intra}}$, %) та відносний довірчий інтервал (Δ_{intra} , %).

Довірчий інтервал визначали за формулою:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, n \times m - 1] \cdot SD_{Z_{intra}} = 1,76 \cdot SD_{Z_{intra}} \quad (4.24)$$

де t – однобічний коефіцієнт Стюдента для довірчої імовірності 95% та числа ступенів свободи ($n \cdot m - 1$); для $n = 5$ та $m = 3$ він дорівнював 1,76.

Відповідно до вимог ДФУ, значення Δ_{intra} не повинно перевищувати максимально допустиму невизначеність результату аналізу ($\max \Delta_{As}$). Отримане значення $\Delta_{intra} = 0,17\%$ було значно меншим за граничне значення $\max \Delta_{As} = 21,34\%$, що свідчило про відсутність значущих випадкових похибок, зумовлених внутрішньолабораторними факторами. Різниця між результатами, отриманими в різні дні різними аналітиками, була статистично незначущою, а всі значення вмісту сухого екстракту кореня пеларгонії знаходилися в межах специфікації.

Таким чином, встановлено, що довірчий інтервал результатів, отриманих за різних внутрішньолабораторних умов, не перевищує максимально допустиму невизначеність, що підтверджувало ВЛП методики. Методика була відтвореною та придатною для кількісного визначення діючої речовини у ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг).

Для порівняння результатів, отриманих за розробленою спектрофотометричною методикою, було проведено аналіз тієї самої серії препарату «Резістол[®]-Таб» за допомогою чинної хроматографічної методики. Хроматограми наведено на рисунку 4.5. Детектування проводили при довжинах хвиль 330 нм (для умкаліну) та 345 нм (для умкалін-7-сульфату).

На хроматограмах було ідентифіковано маркерні сполуки – умкалін та умкалін-7-сульфат, за якими розраховували вміст екстракту коренів пеларгонії. За результатами хроматографічного аналізу вміст екстракту в одній таблетці становив 19,7 мг.

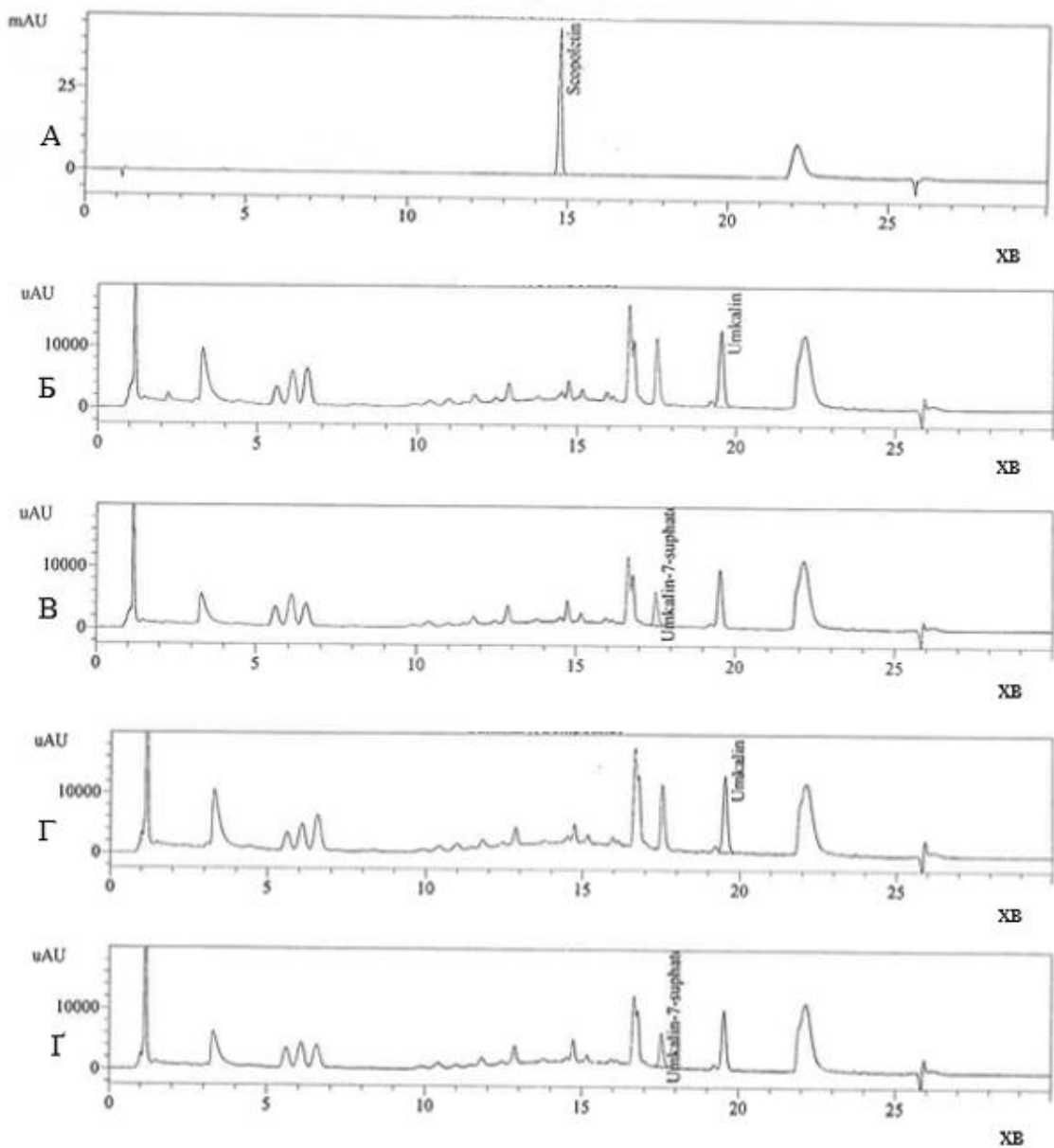


Рис. 4.5. Хроматограми розчину порівняння та випробуваних розчинів: А – розчин порівняння (скополетин), $\lambda=345$ нм; Б – випробуваний розчин 1 (умкалін), $\lambda=330$ нм; В – випробуваний розчин 1 (умкалін-7-сульфат), $\lambda=345$ нм; Г – випробуваний розчин 2 (умкалін), $\lambda=330$ нм; Г – випробуваний розчин 2 (умкалін-7-сульфат), $\lambda=345$ нм

Отже, результати, отримані за розробленою методикою, повністю узгоджувалися з результатами хроматографічного аналізу: в обох випадках вміст сухого екстракту коренів пеларгонії в одній таблетці становив 19,7 мг. Це підтверджувало коректність, точність та надійність розробленої методики.

4.2.6. Оцінювання робасності аналітичної методики

Робасність аналітичної методики характеризує її здатність залишатися нечутливою до невеликих навмисно внесених змін умов проведення аналізу. Одним із ключових аспектів оцінювання робасності є перевірка стабільності випробуваних розчинів та розчину порівняння, яку проводять перед виконанням інших валідаційних досліджень [42-44].

Для оцінювання стабільності готували розчин порівняння та два випробувані розчини (по одному розчину 1 та 2) відповідно до методики 1 та зберігали їх у захищеному від світла місці за кімнатної температури.

Через 40 хв після приготування проводили первинне вимірювання ОГ (t_0), а повторні вимірювання виконували через 2, 4 та 8 год. Для кожної часової точки вимірювали ОГ як випробуваних розчинів, так і розчину порівняння.

Стабільність розчинів оцінювали відповідно до рекомендацій ДФУ [44]. Для цього розраховували відносне стандартне відхилення ($RSDt$) величин нормалізованого аналітичного сигналу (Y_i) для часових точок 0, 2, 4 та 8 год.

Нормалізований аналітичний сигнал розраховували за формулою:

$$Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot 100\%, \quad (4.25)$$

де A_i – оптична густина випробуваних розчинів на певний момент часу;

A_{st} – оптична густина порівняння на певний момент часу.

Довірчий інтервал Δ_t обчислювали за формулою:

$$\Delta_t = t(95\%, n-1) \cdot RSD_t, \quad (4.26)$$

де $t(95\%, n-1)$ – однобічний коефіцієнт Стьюдента для довірчої ймовірності 95% та числа ступенів свободи $n-1$ (при $n = 4$, $t = 2,35$).

Результати вимірювань та розрахунків наведено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Нормалізований аналітичний сигнал (Y_i), та оцінювання стабільності розчинів

Час, год	Y_i , % (розчин 1)	Y_i , % (розчин 2)
0	114,76	114,18
2	114,65	112,52
4	113,62	111,71
8	114,16	111,56
RSD _t	0,45	1,04
Δ_t	1,06	2,45

Відповідно до вимог ДФУ, розчини вважали стабільними, якщо Δ_t не перевищувало максимально допустиму систематичну похибку ($\max\delta$). Раніше було встановлено, що $\max\delta = 6,83\%$ (формула 4.21). Отже, критерій прийнятності мав вигляд:

$$\Delta_t \leq \max\delta \quad (4.27)$$

За результатами проведеного дослідження встановлено, що нормалізований аналітичний сигнал для обох випробуваних розчинів залишався стабільним протягом усього періоду спостереження. Значення Δ_t для обох випробуваних розчинів не перевищували встановленого критерію, що свідчило про відсутність значущих змін аналітичного сигналу в часі.

Таким чином, розчин порівняння та випробувані розчини 1 та 2 були стабільними протягом щонайменше 8 год після приготування, що забезпечувало можливість проведення аналізу без суттєвих часових обмежень. Методика характеризувалася робасністю щодо фактора часу витримання розчинів.

Таким чином, валідаційні дослідження показали, що методика контролю показника «Кількісного визначення» для ЛЗ «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг) відповідала своєму призначенню. Усі оцінені характеристики — специфічність, лінійність, правильність, збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність та робасність (стабільність розчинів) — відповідали встановленим фармакопейним вимогам. Отже, методика характеризувалася високою точністю, відтворюваністю та надійністю і могла бути рекомендована для рутинного використання в лабораторному контролі якості.

ВИСНОВКИ

У роботі було розроблено та валідовано альтернативну методику кількісного визначення танінів для контролю якості лікарського засобу «Резістол[®]-Таб» (таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 20 мг), що дозволило запропонувати доступну заміну високовартісним хроматографічним методам та забезпечити відповідність сучасним фармакопейним вимогам.

1. Експериментально обґрунтовано умови пробопідготовки: встановлено, що екстрагування протягом 60 хв за температури 90°C забезпечувало повне вилучення танінів; за результатами аналізу кінетики реакції з фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом визначено, що стабілізація аналітичного сигналу досягалася через 40 хв після приготування розчинів.

2. Проведено метрологічне оцінювання методики, у результаті якого розраховано максимально допустиму невизначеність результату аналізу, невизначеність пробопідготовки та сумарну невизначеність методики. Показано, що невизначеність пробопідготовки не перевищувала допустимого критерію, що підтверджувало метрологічну коректність методики.

3. Проведено валідацію методики за основними характеристиками: специфічність, лінійність, правильність, збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність та робасність. Встановлено, що методика відповідала критеріям прийнятності та могла бути рекомендована для рутинного контролю якості лікарського засобу «Резістол[®]-Таб».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. European Medicines Agency, (2024). *Assessment report on Pelargonium sidoides DC; Pelargonium reniforme Curt., radix*. Available at: <https://www.ema.europa.eu> [Accessed 03 Apr. 2026].
2. European Pharmacopoeia (2023). *Pelargonii radix*. In: *European Pharmacopoeia 11.3*, monograph 2264. Strasbourg: Council of Europe, p. 5143.
3. Consolidated text: Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (2025). Official Journal of the European Union, [online] Volume 17(321). Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/83/2025-01-01>.
4. Bisi-Johnson, M, Obi, C., Samuel, B., Eloff, J. and Okoh, A. (2017). Antibacterial activity of crude extracts of some South African medicinal plants against multidrug resistant etiological agents of diarrhoea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [online] Volume 17(321). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1802-4> [Accessed 19 Jul. 2017].
5. Maroyi, A. (2025). *Pelargonium reniforme Curtis (Geraniaceae family): Ethnopharmacology of an endangered medicinal plant*. *Asian Journal of Plant Sciences*, [online] Volume 24(3), pp. 192-201. Available at: <https://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2025.192.201>.
6. Victor, J. and Aphane, M., (2014). Taxonomic status of *Pelargonium reniforme Curt. Bothalia - African Biodiversity & Conservation*, [online] Volume 44(1). Available at: <https://doi.org/10.4102/ABC.V44I1.173> [Accessed 13 Jul. 2014].
7. Reina, B.D., Malheiros, S., Vieira, S., Ferreira de Andrade, P. and Dovigo, L. (2024). Unlocking the therapeutic potential of *Pelargonium sidoides natural extract*: A scoping review. *Heliyon*, [online] Volume 10(23). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40554>.
8. Cinatl, J., Wass, M. and Michaelis M. (2024). Multiple mechanisms enable broad-spectrum activity of the *Pelargonium sidoides* root extract EPs 7630

against acute respiratory tract infections. *Frontiers in Pharmacology*, [online] Volume 15(1455870). Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1455870> [Accessed 14 Oct.2024].

9. Kolodziej, H. and Kiderlen, A. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs 7630. *Phytomedicine*, [online] Volume 14(6), pp. 18-26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.020> [Accessed 5 Mar. 2007].

10. Trun, W., Kiderlen, A. and Kolodziej, H. (2006). Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in Leishmania-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps 7630). *Phytomedicine*, [online] Volume 13(8), pp. 570-575. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.07.004> [Accessed 11 Sep. 2006].

11. Moyo, M. and Van Staden, J. (2014). Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. *Journal of Ethnopharmacology*, [online] Volume 152(2), pp. 243-255. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.009> [Accessed 12 Jan. 2014].

12. Fang, L., Zhou, L., Kulić, Ž., Lehner, D., Tamm, M. and Roth, M. (2023). EPs[®] 7630 stimulates tissue repair mechanisms and modifies tight junction protein expression in human airway epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 24(13), 11230. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241311230> [Accessed 1 Jul. 2023].

13. Tahan, F. and Yaman, M., (2013). Can the *Pelargonium sidoides* root extract EPs[®] 7630 prevent asthma attacks during viral infections of the upper respiratory tract in children? *Phytomedicine*, [online] Volume 20(2), pp. 148-150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.02> [Accessed 15 Jan. 2013].

14. Riley, D., Lizogub, V., Heger, M., Funk, P., Mueller, H. and Lehmacher, W. (2019). Treatment with EPs 7630, a *Pelargonium sidoides* root extract, is effective and safe in patients with the common cold: results from a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Integrative Medicine (Encinitas)*,

[online] Volume 18, pp. 42-51. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6601435/> [Accessed Feb. 2019].

15. Baran, A., Kwiatkowska, A. and Potocki, L. (2023). Antibiotics and bacterial resistance – A short story of an endless arms race. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 24(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24065777> [Accessed 15 Mar. 2026].

16. Matthys, H. and Funk, P. (2018). *Pelargonium sidoides* preparation EPs 7630 in COPD: health-related quality-of-life and other patient-reported outcomes in adults receiving add-on therapy. *Current Medical Research and Opinion*, [online] Volume 34, pp. 1245-1251. Available at: <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1416344> [Accessed 30 Jul. 2018].

17. Brendler, T., Stander, M. and van Wyk, B. (2024). Stevens' Cure (Umckaloabo) – the vindication of a patent medicine. *Frontiers in Pharmacology*, [online] Volume 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1294997> [Accessed 24 Jan. 2024].

18. Ingarfield, P., Sogoni, A., Jimoh, M., Rautenbach, F., Kambizi, L. and C. Laubscher. (2023). Total phenols and antioxidant potential of *Pelargonium reniforme* Curtis and *Pelargonium sidoides* DC under different watering frequencies and arbuscular mycorrhiza applications. *Acta Horticulturae*, [online] Volume 1358, pp. 107-114. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1358.15> [Accessed Mar. 2023].

19. Yüksel, M., Yüksel, K. and Topdaş, E. (2025). Phytochemical Contents and In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Root Extracts From *Pelargonium* Species. *Chemistry & Biodiversity*, [online] Volume 22(8). Available at: <https://doi:10.1002/cbdv.202402382> [Accessed 31 Aug. 2025].

20. Kayser, O. and Kolodziej, H. (1995). Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*. *Phytochemistry*, [online] Volume 39(5), pp. 1181-1185. Available at: <https://doi:10.1002/cbdv.202402382> [Accessed 1 Jul. 1995].

21. Viljoen, A., Zhao, J. and Sandasi, M. (2023). Phytochemical distinction between *Pelargonium sidoides* ("Umckaloabo") and *P. reniforme* through ¹H-NMR

and UHPLC–MS metabolomic profiling. *Metabolomics*, [online] Volume 11, pp. 594-602. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0722-2> [Accessed 19 Aug. 2023].

22. Theisen, L. and Muller, C. (2012). EPs 7630 (Umckaloabo), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, [online] Volume 94(2), pp. 147-156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.006> [Accessed 27 Mar. 2012].

23. Willcox, M., Simpson, C., Wilding, S., Stuart, B., Soilemezi, D., Whitehead, A., Morgan, A., Wrixon, E., Zhu, S., Yao, G., Webley, F., Yan, R., Bostock, J., Bell, M., Griffiths, G., Leydon, G., Little, P., Butler, C., Hay, A.D. and Moore, M. (2021). *Pelargonium sidoides* root extract for the treatment of acute cough due to lower respiratory tract infection in adults: a feasibility double-blind, placebo-controlled randomised trial. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, [online] Volume 21(1), p. 48. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7845084/> [Accessed 29 Jan. 2021 April].

24. Kim, C., Griffiths, J. and Taylor, P. (2009). Components derived from *Pelargonium* stimulate macrophage killing of Mycobacterium species. *Journal of Applied Microbiology*, [online] Volume 106(4), pp. 1184-1193. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04085.x> [Accessed 1 Apr. 2009].

25. Zayed, A., Abdelkareem, S., Talaat, N., Dayem, D. and Farag, M. (2025). Tannin in foods: Classification, Dietary Sources, and Processing Strategies to Minimize Anti-Nutrient Effects. *Food and Bioprocess Technology*, [online] Volume 18(11), pp. 9221-9249. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11947-025-04020-3> [Accessed 17 Aug. 2025].

26. Ozogul, Y., Kulawik, P., Ucar, Y., Trif, M., Tadesse, E., Esatbeyoglu, T., Rathod, N. and Ozogul, F. (2025). Tannins for food preservation and human health: A review of current knowledge. *Applied Food Research*, [online] Volume 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.100738> [Accessed 25 Jan. 2025].

27. Rao, M. and Zheng, B. (2025). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Tolerance and Their Antioxidant Properties to Scavenge Reactive Oxygen Species

and Free Radicals. *Antioxidants*, [online] Volume 14(1), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox14010074> [Accessed 7 Jan. 2025].

28. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž. and Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, [online] Volume 21(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules21070901> [Accessed 11 Jul. 2026].

29. Singleton, L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, [online] Volume 299, pp. 152-178. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

30. Ruiz-Vasquez, L., Ruiz Mesia, L., Maco, M., Zapata, J., Cotrina, H., Cobos, M., Pinedo-Cancino, V., Tello, F. and Castro, J. (2026). Optimized Folin–Ciocalteu Method for Determination of Total Polyphenols in Medicinal Plants of the Peruvian Amazon: Validation and Application to Twelve Species. *AppliedChem*, [online] Volume 6(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/appliedchem6010017> [Accessed 23 Feb. 2026].

31. Blainski, A., Lopes, C. and de Mello, J. (2013). Application and analysis of the Folin–Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, [online] Volume 18(6), pp. 6852-6865. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules18066852> [Accessed 6 Jun. 2013].

32. Tor, E., Francis, T., Holstege, D. and Galey, F. (1996). GC/MS Determination of Pyrogallol and Gallic Acid in Biological Matrices as Diagnostic Indicators of Oak Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online] Volume 44, pp. 1275-1279. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf950238k> [Accessed 16 May 1996].

33. *European Pharmacopoeia*, (2022). Supplement 11.0, volume 1. Strasbourg: Council of Europe, p.326.

34. Wiesneth, S. and Jürgenliemk, G. (2017). Total phenolic and tannins determination: a modification of Ph. Eur. 2.8.14 for higher throughput. *Die*

Pharmazie, [online] Volume 72(4), pp. 195-196. Available at: <https://doi.org/10.1691/ph.2017.6911> [Accessed 1 Apr. 2017].

35. Brêtas, J., Pereira, D. and Pianetti, G. (2020). Miniaturized Spectrophotometric Method for Quantification of Tannins in Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit Peel Dried Extracts. *Current Analytical Chemistry*, [online] Volume 16(3), pp. 321-331. Available at: <https://doi.org/10.2174/1573411015666181204115035> [Accessed 3 Apr. 2020].

36. Van Wyngaard, J., Famuyide, I., Invernizzi, L., Ndivhuwo, K., Tordiffe, A., Maharaj, V. and McGaw, L. (2023). Extraction of *Pelargonium sidoides* roots: Impact of ethanol concentration on biological activity of extracts. *South African Journal of Botany*, [online] Volume 162, pp. 667-679. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.058> [Accessed 29 Sep. 2023].

37. Tuominen, A. and Karonen, M. (2018). Variability between organs of proanthocyanidins in *Geranium sylvaticum* analyzed by off-line 2-dimensional HPLC-MS. *Phytochemistry*, [online] Volume 150, pp. 106-117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.03.004> [Accessed 23 Mar. 2018].

38. López-Alarcón, C. and Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, [online] Volume 763, pp. 1-10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051> [Accessed 6 Feb. 2013].

39. Chen, Y., Sugiyama, Y., Abe, N., Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R. and Hirota, A. (2005). DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, [online] Volume 69(5), pp. 999-1006. Available at: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.999> [Accessed 6 May 2005].

40. Георгіянц, В. та Євтіфєєва, О. (2007). Валідація аналітичних методик у фармації: теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. *Фармацевтичний часопис*, [online] 2, сс. 999-1006.

41. Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K. and Harish, R. (2010). Validation of analytical methods – strategies & importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, [online] Volume 2(3), pp. 18-22.
42. ICH, (1994). *Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures*. Geneva: International Conference on Harmonisation.
43. ICH, (1995). *Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Geneva: International Conference on Harmonisation.
44. *Державна Фармакопея України. Доповнення 7. (2024). 2-е вид., т. 2.* Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”.
45. *Державна Фармакопея України. Доповнення 8. (2025). 2-е вид.* Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”.
46. *Державна Фармакопея України. (2015). 2-е вид., т. 1.* Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”.