

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Ханіна Наталія Вадимівна**

УДК 615.322;615.074;615.033.1

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Науково-експериментальні підходи до визначення  
біодоступності важкорозчинних речовин на прикладі  
кверцетину**

226-Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне  
джерело

Ханіна Наталія Н. В. Ханіна

Науковий керівник Георгіянец Вікторія Акопівна,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Харків – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Ханіна Н. В.*. Науково-експериментальні підходи до визначення біодоступності важкорозчинних речовин на прикладі кверцетину – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226-Фармація, промислова фармація (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення науково-практичної задачі визначення біодоступності важкорозчинних речовин на прикладі кверцетину. Автором запропоновано оригінальний підхід для проведення тесту «Розчинення», що відповідає вимогам ДФУ та апробовано його прийнятність для цілей фармацевтичної розробки, подібності та біоеквівалентності лікарських засобів відповідно до вимог Настанови з біоеквівалентності.

*Перший розділ* є оглядом існуючих літературних джерел з даної теми і описує накопичені експериментальні дані щодо розчинності кверцетину, який належить до IV класу, згідно до класифікації БСК, показують, що на даний момент не існує єдиної думки наукового кола дослідників стосовно точно визаченого значення розчинності кверцетину. Крім того, висвітлюється біодоступність біологічно активних речовин класу флавоноїдів, наводиться їх класифікація та фактори, що можуть здійснювати значний вплив на біодоступність рослинних речовин. Окрема увага приділена також ряду фармакотерапевтичних ефектів, що були продемонстровані у великій кількості наукових досліджень і є обґрунтуванням актуальності вивчення кверцетину як перспективної біологічно активної речовини. Виходячи з цього, існує потреба у розробці методу дослідження розчинності кверцетину, а також розробці нових підходів до вивчення вивільнення речовин з низькою розчинністю у водних середовищах в рамках проведення *in vitro* та тесту «Розчинність», як

альтернативу проведення тестів *in vivo*.

Оскільки точне значення межі розчинності кверцетину невідомо з літературних джерел, а вивчення біоеквівалентності та біодоступності обмежено через низьку розчинність у водному середовищі, то перспективним є проведення дослідження з вивчення кінетики вивільнення кверцетину в рамках фармацевтичної розробки нових генеричних та вивчення складу існуючих брендових лікарських засобів.

У другому розділі було сформовано методологію проведення запланованих досліджень з вивчення біодоступності кверцетину. Наведено теоретичне підґрунтя процесів розчинення та природи розчинів, а також факторів, що можуть мати потенційний вплив на процес розчинення при проведенні досліджень з біодоступності. Сформульовано необхідність встановлення кількісного значення межі розчинності кверцетину з огляду на те, що сучасні літературні джерела не дають точного значення цієї фізико-хімічної характеристики. Окреслено існуючі термодинамічні обмеження, що можуть заважати в процесі встановлення межі розчинності. Детально викладено етапи запланованого експерименту та шляхи, за якими заплановано здійснити апробацію розроблених нових підходів та методів.

Уперше запропоновано уніфіковану термінологію для проведення аналізу та стандартизації речовин рослинного походження, що не існує наразі в жодному нормативному документі України, Європи чи США. Сформульовано набір критеріїв, яким повинна відповідати субстанція, щоб бути класифікованою як речовина-маркер для вирішення різноманітних аналітичних завдань.

Визначено аналітичні методи дослідження, що були використані в процесі дослідження. Ці методи зумовлюють перелік обладнання, реактивів та процедур, які є принципово необхідними для виконання мети дослідження. Треба відзначити, що перелік процедур та обладнання для визначення розміру часток, вологи та домішок був розроблений згідно до вимог Настанови, та відповідає вимогам ДФУ, сертифіковано та метрологічно повірено. Важливим аспектом є і

те, що обладнання відповідає очікуваним діапазонам вимірюваних концентрацій, адже ми вимушені працювати із речовинами з дуже низькою розчинністю, що забезпечує дуже низькі значення вимірюваних концентрацій.

У *третьому розділі* детально викладно опис підготовчого етапу, що присвячений дослідженню факторів, які можуть впливати на розчинність кверцетину. Визначено потенційний вплив розміру часток на кінетику розчинення кверцетину. За результатами вимірювань встановлено, що розмір більшості часток знаходиться в межах 60-90 мкм. Базуючись на розмірі часток обґрунтовано вибор часу розчинення кверцетину для здійснення наступних експериментів. Досліджено дві важливі характеристики, що безпосередньо впливають на швидкість розчинності кверцетину, - залежність концентрації кверцетину, що переходить у розчин. від часу проведення аналізу, а також залежність від об'єму розчинника.

Уперше розроблено аналітичну методику встановлення кількісного значення межі розчинності кверцетину у водних середовищах з рН, що дорівнює 7, на основі методу ВЕРХ-МС. Ступінь вивільнення кверцетину в розчин розраховували як частку кверцетину, що перейшов у розчин, до початкової наважки, взятої для проведення дослідження та вимірювали у відносних одиницях. Аналіз отриманої залежності дозволяє стверджувати, що досягнення концентрації кверцетину близької до рівноважної (псевдорівноважної) відбувається протягом 30 хв. Відповідно до вимог БСК, вивільнення речовини в розчин є задовільним при розчиненні 80% вихідної наважки досліджуваної речовини. Слід зазначити, що концентрація кверцетину в розчині, що відповідає цим умовам, дорівнює 0,0047 мг/мл, що досягається через 20 хв. Це свідчить про те, що максимальна концентрація була досягнута і варіабельність усіх наступних вимірювань пов'язана лише з похибкою аналізу. Отримане значення часу, необхідного для розчинення обраної кількості кверцетину в заданому об'ємі розчинника, дозволило перейти до встановлення фактичної межі розчинності кверцетину шляхом визначення його концентрації у водних розчинах.

Знаючи тип кореляційної залежності, можна розрахувати значення межі розчинності, взявши першу похідну, значення якої буде відповідати значенню точки перегину аналізованої кривої. Таким чином, використовуючи поліноміальну залежність третього ступеня та розв'язуючи систему рівнянь за допомогою математичного пакета MicroCal Origin, отримали значення концентрації, що відповідає точці перегину досліджуваної залежності. Отримане значення відповідає межі розчинності кверцетину. За результатами розрахунків встановлено межу розчинності кверцетину в водних середовищах (3,1 мкг/мл).

Розроблено альтернативний метод визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі при кислих значеннях рН (від 3,0 до 5,0) із застосуванням методу визначення загального органічного карбону (ТОС). Методом екстраполяції результатів, отриманих для середовищ із кислим рН, використовуючи ступеневу функцію і вирішуючи систему рівнянь, отримано значення концентрації, відповідної точки при рН 7. Отримане значення відповідає межі розчинності кверцетину. Отримане значення становило 0,7 мкг/мл в результаті вирішення рівняння ступеневої функції. Необхідно відзначити, що отримані дані корелюються з даними, отриманими нами в експерименті із застосуванням методу ВЕРХ-МС.

*Четвертий розділ* присвячений апробації розробленого методу в дослідженнях з фармацевтичної розробки монокомпонентного лікарського засобу «Квертин».

Розроблено та валідовано оригінальну методику кількісного визначення кверцетину в умовах проведення тесту «Розчинення» для таблеток «Квертин», методом хроматомас-спектрометрії.

Вперше отримано профілі вивільнення кверцетину у 3-х різних водних середовищах розчинення: з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8, для препарату «Квертин» таблетки жувальні по 40 мг згідно до вимог БСК, використовуючи розроблений метод із відповідною кількістю замін об'єму розчинника. Проаналізовано

фармакокінетичні криві, одержані в процесі фармацевтичної розробки препарату «Квертин», які були отримані у процесі незалежних досліджень з вивчення біодоступності кверцетину на тваринах.

Вперше проведено кореляційні дослідження даних, одержаних в ході фармацевтичної розробки в експериментах *in vitro/in vivo* для препарату «Квертин» з використанням методології IVIVC. Кореляційна залежність рівня А – вивільнення *in vivo* (%) / *in vitro* (%) характеризувалось високим коефіцієнтом кореляції 0,9588 що свідчить про значний кореляційний зв'язок аналізованих параметрів вивільнення кверцетину, та відповідають вимогам IVIVC, де коефіцієнт кореляції повинен бути більше 0,7. Наявність *in vivo/in vitro* кореляції може стати ефективним прогностичним інструментом для оцінки поведінки кверцетину в препараті «Квертин» в умовах *in vivo* на підставі профілів розчинення препарату *in vitro*, що дозволяє значно зменшити матеріальні та часові витрати у подальших дослідженнях препарату.

П'ятий розділ описує використання запропонованої методології вивчення кінетики вивільнення кверцетину для доведення подібності оригінальних препаратів з різними складами - «Синупрет-екстракт» та «Синупрет-форте». Дослідження було проведено згідно з вимогами Настанови з процедури проведення біоеквівалентності. Коректність розробленої раніше методики доведено дослідженнями валідаційних характеристик.

Відповідно до методології процедури досліджень біоеквівалентності за вимогами Настанови, експериментально встановлено відсутність впливу активних та допоміжних компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища в тесті «Розчинення», відхилення рН в умовах методики не перевищувало 0,05.

Отримано профілі розчинення для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» в середовищах з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8. Порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору подібності показали, що при рН 1,2, що моделює рН шлунку, профілі розчинення лікарських засобів «Синупрет» та

«Синупрет-форте» є подібними ( $f_2 = 64,73 > 50$ ), в той час як при більших значеннях рН – 4,5 та 6,8 – не є подібними ( $f_2 = 40,56$  та 21,24 відповідно).

Отримані графічні залежності дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біолейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних - не перевищує 10%. Вміст кверцетину дорівнює 85% та досягається для всіх вивчених середовищ за 30 хвилин

Вміст *шостого розділу* стосується апробації запропонованої методології до вивчення вивільнення кверцетину у середовищах із нейтральним рН, було досліджено біоеквівалентність генеричного препарату «Препарат Д» та референтного - «Детралекс» - відповідно до всіх вимог процедури біолейверу.

Для підтвердження коректності застосування методики ВЕРХ-МС для проведення біолейверу, вивчено валідаційні характеристики. Встановлено відсутність впливу активних та допоміжних речовин на рН середовища при проведенні тесту «Розчинення» для досліджуваних препаратів (відхилення значення рН склало менше 0,05).

Для оцінки еквівалентності досліджуваних препаратів отримані профілі розчинення для «Препарату Д» та «Детралексу» в умовах, описаних в Настанові з проведення біолейверу. Порівняння профілів та розрахунок фактору подібності  $f_2$  показали, що профілі розчинності препаратів є подібними при рН 4,5 ( $f_2 = 54,8$ ), в той час як при рН 1,2 та 6,8 – неподібними ( $f_2 = 40,59$  та 26,71 відповідно).

Отримані графічні залежності дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біолейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%. Завдяки проведеним дослідженням, було підтверджено, що запропонований оригінальний підхід може бути використано для вирішення завдання з вивчення біоеквівалентності генеричного та референтного препаратів.

*Ключові слова: біолейвер, кверцетин, високоефективна рідинна хроматографія, мас-спектрометрія, біофармацевтична система класифікацій (БСК), тест «Розчинення».*

Список публікацій здобувача:

1. Khanina N., Georgiyants V., Khanin V. Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 3 (43), P. 58–66. (*Scopus, Q3*) doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293> (Особистий внесок – брала участь в проведенні експерименту та підготовці статті).
2. Khanina N., Georgiyants V., Khanin V. Development of a new solution for determining the solubility limit of quercetin and other poorly soluble substances in aqueous solutions using the method for determining total organic carbon. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 4 (44). P. 54–62. (*Scopus, Q3*) doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.286639> (Особистий внесок – брала участь в проведенні експерименту та підготовці статті).
3. The New Method to Study the Kinetics of Release of Hardly Soluble API from Solid Oral Dosage Forms on the Example of Quercetin / N. V. Khanina, V. A. Georgiyants, V. A. Khanin, I. A. Zupanets. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023, № 21 (3), P. 50–60. doi: <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290665> (Особистий внесок – брала участь у проведенні експерименту, узагальненні результатів експерименту та підготовці статті).
4. Ханіна Н. В., Георгіянц В. А., Ханін В. А. Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, – кверцетину : пат. № 152115 Україна. № и 2021 05955 ; заявл. 23.10.2021 ; опубл. 03.11.2021, Бюл. № 44 (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, розробці методу та оформленні патенту).
5. Khanina N., Khanin V., Georgiyants V. Development of new approaches for studying the dissolution profiles of herbal preparations according to the requirements of the Biopharmaceutical Classification system. *Science and practice* : матеріали 10



Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., постерна доповідь, 15 листопада 2019 р., м. Каунас, Литва: Lithuanian University of health Sciences, 2019.

6. Khanina N., Khanin V., Georgiyants V. Determination of flavonoids in herbal preparations. *Implementation of modern scientific opinions in practice* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 20-21 березня 2023 р., м. Більбао, Іспанія, European conference, 2023. P. –

7. Khanina N., Khanin V., Georgiyants V. Determination of rutin in herbal preparations. *Problems of the development of science and the view of society* : матеріали XI Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Грац, Австрія, 21-24 березня 2023 р., International Science Group, 2023. P. –

8. Khanina N., Khanin V., Georgiyants V. Determination of caffeic acid in herbal preparations. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 18 травня 2023 р. Харків, НФаУ, 2023. P. –

9. Ханіна Н. В., Георгіянци В. А., Ханін В. А. Новий підхід вирішення проблеми біокейверу для речовин 3 та 4 класу БСК. *Безперевний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи* : матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, м. Харків, 01 листопада 2023 р., Харків, НФаУ, 2023. С. 299–301.

10. Ханіна Н. В., Георгіянци В. А., Ханін В. А. Новий підхід вивчення вивільнення кверцетину у процесі фармакокінетичних досліджень. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології* : матеріали III Міжнародна наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 24 листопада 2023 р. Харків, НФаУ, 2023. С. –

11. Ханіна Н.В., Георгіянци В. А., Ханін В.А. Розробка методики вибору речовини маркеру при аналізі комбінованих рослинних препаратів, що містять кверцетин. *Innovate scientific research: theory and practice* : матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, м. Стокгольм, Швеція, 21-24 листопада 2023 р., Стокгольм, 2023. P.

## ANNOTATION

*Khanina N. V.* Scientific and experimental solutions to determining the bioavailability of sparingly soluble substances using the example of quercetin - Qualifying scientific work with manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the specialty 226-Pharmacy, manufacturing pharmacy (22 - Health care). – National Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation provides a theoretical justification and an experimental solution to the scientific and practical problem of determining the bioavailability of sparingly soluble substances using the example of quercetin. The author proposed an original approach for conducting the "Dissolution" test that meets the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine and tested its acceptability for the purposes of pharmaceutical development, similarity and bioequivalence of medicinal products in accordance with the requirements of the Bioequivalence Guidelines.

The *first chapter* is an overview of the existing literature on the topic and describes the accumulated experimental data on the solubility of quercetin, which also belongs to class IV, according to the BCS classification, showing that there is currently no consensus among the scientific community regarding the exact value of quercetin solubility. In addition, the bioavailability of biologically active substances of the flavonoid class is highlighted, their classification and factors that can have a significant impact on the bioavailability of plant substances are given. Emphasis is also placed on a few pharmacotherapeutic effects that have been demonstrated in many scientific studies and justify the relevance of studying quercetin as a promising biologically active substance. Based on this, there is a necessity to develop a method for studying the solubility of quercetin, as well as to develop new approaches to studying the release of

substances with low solubility in aqueous media within the framework of *in vitro* and solubility tests as an alternative to *in vivo* tests.

Since the exact value of the solubility limit of quercetin is unknown from the literature, and the study of bioequivalence and bioavailability is limited due to its low solubility in the aqueous medium, it is reasonable to conduct a study to determine the kinetics of quercetin release as part of the pharmaceutical development of new generic drugs and study the composition of existing branded drugs.

In the *second chapter*, the methodology for conducting the planned studies on the bioavailability of quercetin was formed. The theoretical basis of dissolution processes and the nature of solutions, as well as factors that can potentially affect the dissolution process in bioavailability studies, are presented. The importance of establishing a quantitative value of the solubility limit of quercetin is formulated, given that modern literature sources do not provide an accurate value of this physicochemical characteristic. The existing thermodynamic limitations that may interfere with the process of establishing the solubility limit are outlined. The stages of the planned experiment and the ways in which the developed new approaches and methods will be tested are described in detail.

For the first time, a unified terminology for the analysis and standardization of substances of plant origin is proposed, which does not currently exist in any regulatory document of Ukraine, Europe, or the United States. A group of criteria has been proposed that a substance must meet to be classified as a marker substance for solving various analytical problems.

The analytical research methods used in the research process are identified. These methods determine the list of equipment, reagents and procedures that are strictly required to fulfill the purpose of the study. It should be noted that the list of procedures and equipment for determining the size of particles, moisture and impurities was developed in accordance with the requirements of the Guidelines and meets the requirements of the SPU and is certified and metrologically verified. Another important

aspect is that the equipment meets the expected ranges of measured concentrations, because we must work with substances with very low solubility, which ensures very low measured concentrations.

The *third chapter* describes in detail the preliminary stage, which is devoted to the study of factors that may affect the solubility of quercetin. The potential effect of particle size on the kinetics of quercetin dissolution was determined. According to the results of measurements, it was found that the size of most particles is in the range of 60-90  $\mu\text{m}$ . Based on the particle size, the choice of quercetin dissolution time for further experiments was justified. Two important characteristics that directly affect the rate of quercetin solubility were investigated: the dependence of the concentration of quercetin passing into solution on the time of analysis, as well as the dependence on the volume of solvent.

An analytical method for the quantitative determination of the solubility limit of quercetin in aqueous media with a pH of 7 based on HPLC-MS was developed for the first time. The degree of release of quercetin into solution was calculated as the proportion of quercetin that passed into solution to the initial sample taken for the study and measured in relative units. The analysis of the obtained dependence suggests that the quercetin concentration close to the equilibrium (pseudo-equilibrium) is reached within 30 minutes. In accordance with the requirements of the BCS, the release of a substance into solution is satisfactory when 80% of the initial sample of the test substance is dissolved. It should be noted that the concentration of quercetin in the solution that meets these conditions is 0.0047 mg/ml, which is reached after 20 minutes. This indicates that the maximum concentration has been reached and the variability of all subsequent measurements is due only to the analysis error. The obtained value of the time required to dissolve the selected amount of quercetin in each volume of solvent allowed us to proceed to establish the actual solubility limit of quercetin by determining its concentration in aqueous solutions.

Knowledge of the type of correlation relationship makes it easy to calculate the solubility limit by taking the first derivative, the value of which will correspond to the value of the inflection point of the analyzed curve. Thus, using a third-degree polynomial relationship and solving the system of equations using the MicroCal Origin mathematical package, we obtained the concentration value corresponding to the inflection point of the dependence under study. This value corresponds to the solubility limit of quercetin. Based on the results of the calculations, the solubility limit of quercetin in aqueous media was established (0.0031 mg/ml).

An alternative method for determining the solubility limit of quercetin in aqueous medium at acidic pH values (from 3.0 to 5.0) using the method of determining total organic carbon (TOC) was developed. By extrapolating the results obtained for media with an acidic pH, using a power function and solving the system of equations, the concentration value corresponding to the point at pH 7 was obtained. This value corresponds to the solubility limit of quercetin. The value obtained was 0.7  $\mu\text{g/ml}$  because of solving the power function equation. It should be noted that the data obtained correlates with the data obtained in the experiment using the HPLC-MS method.

The *fourth chapter* is devoted to the approbation of the developed method in research on the pharmaceutical development of the monocomponent medicinal product "Quertin".

The original methodology for the quantitative determination of quercetin under the conditions of conducting the "Dissolution" test for "Quertin" tablets by the chromatography-mass spectrometry method was developed and validated.

For the first time, the release profiles of quercetin in 3 different aqueous dissolution media were obtained: with pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8, for the drug "Quertin" chewable tablets of 40 mg according to the requirements of the BCS, using the developed method with the appropriate by the number of solvent volume replacements. Pharmacokinetic curves obtained in the process of pharmaceutical development of

"Quertin" drug, which were obtained in the process of independent studies on the bioavailability of quercetin in animals, were analyzed.

Correlation studies of the data obtained during pharmaceutical development in *in vitro*/*in vivo* experiments for the drug Quertin using the IVIVC methodology were conducted for the first time. Correlation dependence of level A - release *in vivo* (%) / *in vitro* (%) was characterized by a high correlation coefficient of 0.9588, which indicates a significant correlation between the analyzed parameters of quercetin release, and meet the requirements of IVIVC, where the correlation coefficient should be greater than 0.7. The presence of *in vivo*/*in vitro* correlation can be an effective prognostic tool for assessing the behavior of quercetin in the drug "Quertin" *in vivo* based on the drug dissolution profiles *in vitro*, which can significantly reduce material and time costs in further studies of the drug.

The *fifth chapter* describes the use of the proposed methodology for studying the kinetics of quercetin release to prove the similarity of the original drugs with different compositions - "Sinupret-extract" and "Sinupret-forte". The study was carried out in accordance with the requirements of the Guidelines on the procedure for bioequivalence. The correctness of the previously developed methodology was proven by studies of validation characteristics.

In compliance with the methodology of the bioequivalence study procedure as required by the Guideline, it was experimentally established that the active and excipients of the study drugs did not affect the pH of the medium in the Dissolution test, the pH deviation under the conditions of the methodology did not exceed 0.05.

The dissolution profiles for Sinupret extract and Sinupret-forte were obtained in media with pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8. Comparison of the dissolution profiles and calculation of the similarity factor showed that at pH 1.2, which models the pH of the stomach, the dissolution profiles of Sinupret and Sinupret-Forte are similar ( $f_2 = 64.73 > 50$ ), while at higher pH values - 4.5 and 6.8 - they are not similar ( $f_2 = 40.56$  and  $21.24$ , respectively).

The obtained graphical dependencies allow us to conclude that the results obtained meet the BCS requirements for biowaiver results, the relative standard deviation of the first point does not exceed 20% and the subsequent ones do not exceed 10%. The quercetin content is 85% and is achieved for all studied media within 30 minutes.

The content of the *sixth chapter* concerns the approbation of the proposed methodology for studying the release of quercetin in environments with neutral pH, the bioequivalence of the generic drug "Drug D" and the reference - "Detralex" - in accordance with all the requirements of the biowaiver procedure was investigated. Validation characteristics were studied to confirm the correctness of the HPLC-MS method for biowaiver.

The absence of influence of active and excipients on the pH of the medium during the "Dissolution" test for the studied drugs was established (the deviation of the pH value was less than 0.05).

To evaluate the equivalence of the studied drugs, dissolution profiles were obtained for "Drug D" and "Detralex" under the conditions described in the Guidelines for bioequivalence. Comparison of the profiles and calculation of the similarity factor  $f_2$  showed that the solubility profiles of the drugs are similar at pH 4.5 ( $f_2 = 54.8$ ), while at pH 1.2 and 6.8 they are dissimilar ( $f_2 = 40, 59$  and  $26.71$ , respectively).

The resulting graphical dependencies allow us to conclude that the obtained results meet the requirements of the BCS to the results of the biowaver, the relative standard deviation of the first point does not exceed 20% and the following points do not exceed 10%. Thanks to the conducted research, it was confirmed that the proposed original approach can be used to solve the task of studying the bioequivalence of generic and reference drugs.

*Key words: biowaiver, quercetin, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, biopharmaceutical classification system (BCS), 'Dissolution' test.*

## ЗМІСТ

Анотація	2
Список публікацій здобувача	8
Annotation	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
ОГЛЯД СУЧАСНИХ ПІДХОДІВ ДО ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ	
РОЗДІЛ 1 РОЗЧИНЕННЯ РОСЛИННИХ КОМПОНЕНТІВ. ЗОКРЕМА, - КВЕРЦЕТИНУ (Огляд літератури)	29
1.1 Сучасний стан і проблеми дослідження біоеквівалентності <i>in vitro</i>	29
1.2 Оцінка біодоступності та біоактивності рослинних активних компонентів	33
1.3 Фактори, що потенційно впливають на біодоступність природних речовин	36
1.4 Характеристика кверцетину та його місце серед флавоноїдів	37
1.4.1 Загальна інформація	37
1.4.2 Фармакотерапевтичні ефекти кверцетину	40
1.4.3 Біодоступність кверцетину	46
1.4.4 Оцінка проникності кверцетину крізь мембрани людського організму	47
1.4.5 Шляхи покращення розчинності і біодоступності	50
Висновки до розділу 1	51
РОЗДІЛ 2 МЕТОДОЛОГІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ, ОБ'ЄКТИ, ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ	52
2.1 Формування методології експерименту для визначення біодоступності кверцетину	52
2.1.1 Теорія розчинів і процесу розчинення	52
2.1.2 Неоднозначність визначення розчинності в аналітичній хімії та фармакопейному аналізі	53



2.1.3	Аналіз факторів, що впливають на розчинність при дослідженні біодоступності	54
2.1.4	Проблеми визначення біодоступності кверцетину	57
2.1.5	Обґрунтування методології	57
2.1.6	Етапи дослідження для експериментального підтвердження	59
2.1.7	Апробація підходу для вирішення різних задач	59
2.2	Уніфікація термінології для аналізу та стандартизації природних речовин	60
2.3	Обладнання та матеріали	61
2.4	Обробка отриманих даних	64
РОЗДІЛ 3	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ЗНАЧЕННЯ МЕЖІ РОЗЧИННОСТІ КВЕРЦЕТИНУ	65
3.1	Вивчення впливу розміру часток кверцетину на кінетику розчинення	66
3.2	Конкретизація етапів дослідження межі розчинності кверцетину	67
3.3	Визначення межі розчинності кверцетину методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією	68
3.3.1	Хроматографічні умови методу HPLC-МС	68
3.3.2	Обробка отриманих даних	70
3.3.3	Умови проведення тесту «Розчинення» відповідно до вимог БСК	70
3.3.4	Результати експериментальних досліджень першого етапу	71
3.3.5	Кількісне визначення концентрації межі розчинності кверцетину	73
3.3.6	Статистичний аналіз одержаних даних	77
3.4	Визначення межі розчинності кверцетину методом визначення загального органічного вуглецю (ТОС)	81
3.4.1	Приготування досліджуваних розчинів	83
3.4.2	Результати визначення межі розчинності кверцетину методом	84

ТОС		
3.4.3	Статистичний аналіз одержаних даних	87
	Висновки до розділу 3	91
РОЗДІЛ 4	ДОСЛІДЖЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ В ПРОЦЕСІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ	93
4.1	Розробка методики визначення кверцетину	94
4.1.1	Умови хроматографування	94
4.1.2	Валідація розробленої методики	97
4.2	Дослідження коливань рН при проведенні тесту «Розчинення»	101
4.2.1	Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту «Розчинення»ДФУ	102
4.2.2	Методологія підготовки зразків	104
4.3	Результати дослідження профілів розчинення	105
4.4	Результати досліджень препарату «Квертин», що були проведені <i>in vivo</i>	107
4.5	Порівняння одержаних результатів досліджень <i>in vivo/in vitro</i> .	113
	Висновки до розділу 4	119
РОЗДІЛ 5	ВИВЧЕННЯ ПОДІБНОСТІ МІЖ РІЗНИМИ СКЛАДАМИ ПРЕПАРАТІВ НА ПРИКЛАДІ ВИВЧЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ З ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ СИНУПРЕТ ЗА ПРОЦЕДУРОЮ БІОВЕЙВЕРА	121
5.1	Методика кількісного визначення кверцетину методом HPLC-MS	123
5.2	Валідація розробленої методики	125
5.3	Вплив рН на проведення тесту Розчинення	132
5.4	Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту «Розчинення»ДФУ	134

	19	
5.5	Методологія підготовки зразків	136
5.6	Результати дослідження профілів розчинення для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте»	136
	Висновки до розділу 5	143
РОЗДІЛ 6	ВИВЧЕННЯ БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ДЕТРАЛЕКС ТА ПРЕПАРАТУ Д ЗГІДНО З УМОВАМИ НАСТАНОВИ З БІОВЕЙВЕРУ ТА ВИКОРИСТАННЯ НОВОГО ПІДХОДУ ДО ВИВЧЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ	145
6.1	Методика кількісного визначення кверцетину методом HPLC-MS	147
6.2	Валідація розробленої методики	149
6.3	Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту розчиненняДФУ	156
6.4	Вплив рН на проведення тесту «Розчинення»	158
6.5	Результати дослідження профілів розчинення для препаратів «Детралекс» та «Препарат Д»	159
	Висновки до розділу 6	167
	ВИСНОВКИ	169
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	172
	ДОДАТКИ	185

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ (HPLC)	–	Вискокоєфективна рідинна хроматографія
МС (MS)	–	Мас-спектрометрія
ТОС	–	Визначення загального органічного вуглецю
БСК (BCS)	–	Біофармацевтична система класифікації
ДФУ	–	Державна Фармакопея України
МОЗ	–	Міністерство охорони здоров'я
СТ-Н МОЗ/ Настанова	–	Настанова МОЗ
США	–	Сполучені Штати Америки
БЕ	–	Біоеквівалентність
УФВ	–	ультрафіолетове випромінювання
АФК	–	Активні форми кисню
РФ	–	Рухома фаза
IVIVC	–	Метод кореляції даних <i>in vitro-in vivo</i>
FDA	–	Управління продовольства та медикаментів США
QUE	–	Кверцетин
USP	–	Фармакопея Сполучених Штатів Америки
$AUC_{(0-t)}$	–	Площа під кривою концентрація / час з моменту введення лікарського засобу до останньої точки, що визначається (t)
$AUC_{(0-\infty)}$	–	Площа під кривою концентрація/час, екстрапольована до нескінченності
$AUC_{(0-\tau)}$	–	Площа під кривою концентрація / час в стаціонарному стані
$C_{max}$	–	Максимальна концентрація аналіту
$t_{max}$	–	Час досягнення $C_{max}$
$t_{1/2}$	–	Період напіввиведення

## ВСТУП

*Обґрунтування вибору теми дослідження.* Біофармацевтична система класифікацій (БСК) знайшла широке застосування у галузі розробки нових ліків, розробки продуктів та науки про регулювання лікарських засобів. Класифікація характеризує два найважливіших чинника, які впливають всмоктування ліків при пероральному прийомі; розчинність та кишкову проникність, і він виявився дуже корисним та широко визнаною відправною точкою для розробки лікарських препаратів та регулювання лікарських засобів. Механістична основа підходу БСК, безперечно, сприяла його широкому поширенню та корисності. Тим не менш, за простотою БСК ховається безліч детальних складностей, як *in vitro*, так і *in vivo*, які необхідно оцінювати та досліджувати для будь-якого конкретного лікарського засобу та лікарського препарату.

Належність будь-якої речовини рослинного чи синтетичного походження до одного з чотирьох існуючих класів БСК грає важливу роль, адже, за сучасними нормами та правилами, класифікування за БСК визначає чи можливо проводити дослідження *in vitro*. Для великої кількості субстанцій, єдиним прийнятним методом досліджень з біоеквівалентності, згідно до умов нормативної документації (Настанова «Лікарські засоби, дослідження біоеквівалентності», далі - Настанова), є лише проведення процедури *in vivo*. Причиною таких обмежень є низька або дуже низька розчинність або проникність великої кількості біологічно активних речовин, як рослинного походження, так і синтетичного.

Біоеквівалентність (БЕ) є одною з головних процедур для лікарських засобів як для інноваційних, так і для генеричних продуктів. Для інноваційних продуктів БЕ встановлює терапевтичну еквівалентність між комерційним продуктом на ринку та продуктом клінічного масштабу, який пройшов III фазу тестування

безпеки та ефективності. Базові дослідження фази III, які встановлюють докази щодо показань на етикетці, застосування(*iv*) і дозування, вимагають, щоб клінічно протестований продукт фази III продемонстрував докази біодоступності. Усі наступні продукти, які містять той самий «препарат» або «активний фармацевтичний інгредієнт» і етикетку, повинні бути біоеквівалентними цьому клінічно випробуваному продукту.

Підхід БСК встановив, що на основі поточного наукового розуміння процесів розчинення та шлунково-кишкового тракту, які проходять пероральні лікарські засоби, тести *in vivo* не повинні вимагатися для препаратів із певними характеристиками лікарського засобу (наприклад, висока проникність, висока розчинність препаратів у продуктах, які швидко розчиняються). Поточна практика Управління продовольства та медикаментів США (FDA) щодо біоетверів БСК обмежена лікарськими речовинами класу I (висока проникність, висока розчинність). Рекомендації Європейського агентства з лікарських засобів 2010 року щодо біоеквівалентності, також розширюють обговорення біоетверів до класу III (ліки з низькою проникністю та високою розчинністю). В обох випадках важливо, щоб препарат демонстрував певні характеристики розчинення *in vitro*, тобто швидке або дуже швидке розчинення. Для лікарських засобів із вищезазначеними характеристиками проникності та розчинності, науково обґрунтований тест на розчинення фактично надає кращий доказ біоеквівалентності.

Актуальною проблематикою наразі є те, що велика кількість речовин, що використовують для виробництва нових, як брендових лікарських засобів, так і генеричних належать саме до IV класу БСК. Це призводить до неможливості проведення досліджень *in vitro* та коректного тесту «Розчинення», зважаючи на низьку або дуже низьку розчинність.

Накопичені експериментальні дані щодо розчинності Кверцетину, який теж належить до IV класу, згідно до класифікації БСК, показують, що на даний

момент не існує єдиної думки наукового кола дослідників стосовно точно визначеного значення розчинності кверцетину. Виходячи з цього, існує потреба у розробці методу дослідження розчинності кверцетину, а також розробці нових підходів до вивчення вивільнення речовин з низькою розчинністю у водних середовищах в рамках проведення *in vitro* та тесту «Розчинення», як альтернативу проведення тестів *in vivo*.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційну роботу виконано відповідно до планів МОЗ та НАМН України, вона є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету за темою «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» № державної реєстрації 0114U000949.

**Мета і завдання дослідження.** Метою наукового дослідження є розробка нового підходу до проведення тесту «Розчинення» для важкорозчинних речовин на прикладі кверцетину, що спрямований на вивчення їх кінетики вивільнення у водні середовища для подальшого проведення тестів біокейверу або вивчення біодоступності лікарських засобів.

Для досягнення визначеної мети необхідно було розв'язати такі завдання:

1. Проаналізувати літературні дані щодо сучасного стану досліджень біодоступності/біоеквівалентності *in vitro*, в тому числі рослинних компонентів, систематизувати дані щодо фізико-хімічних та фармакологічних властивостей кверцетину та його біодоступності;
2. Теоретично обґрунтувати та сформулювати підхід щодо методології визначення кінетики вивільнення малорозчинних речовин в умовах тесту «Розчинення», що відповідає фармакопейним вимогам, визначити фактори та проблеми, що впливають на його результати;
3. Розробити методики кількісного визначення кверцетину у водному середовищі:

– методом ВЕРХ-МС,  
методом ТОС;

4. Методами кореляційного аналізу розрахувати точне значення межі розчинності кверцетину за розробленими методиками;

5. Визначити можливість імплементації запропонованого підходу та розробити методики для дослідження вивільнення кверцетину з лікарських засобів, вирішуючи різні аналітичні завдання, згідно з вимогами Настанови:

- Дослідити вивільнення кверцетину як приклад розробки нового лікарського препарату, що містить індивідуальний АФІ кверцетину згідно з вимогами Настанови. Провести кореляційний аналіз одержаних даних кінетики вивільнення кверцетину із препарату «Квертин», отриманих *in vitro* із даними, отриманими *in vivo*.
- Визначити подібність між різними складами препаратів, що містять кверцетин, шляхом вивчення його вивільнення з лікарських засобів за процедурою біоверифікації.
- Вивчити біоеквівалентність генеричного препарату згідно з умовами настанови з біоверифікації та використання нового підходу до вивчення вивільнення кверцетину, для дослідження відтворюваності від серії до серії препарату (досліджуваного і референтного).

6. За результатами даних щодо біодоступності кверцетину з досліджуваних лікарських форм оцінити можливість використання запропонованого підходу для задач, визначених Настановою з біоеквівалентності

*Об'єкт дослідження* – Дослідження біодоступності АФІ синтетичного та природного походження, що є важкорозчинними у водному середовищі.

*Предмет дослідження* – Розробка методів та підходів до визначення біодоступності кверцетину, дослідження кінетики вивільнення кверцетину з моно- та полікомпонентних лікарських засобів, що містять біоактивні речовини



рослинного походження.

*Методи дослідження.* Для аналізу кверцетину у субстанції та лікарських препаратах, та розробки аналітичних методик використовували сучасні фізико-хімічні аналітичні методи – ВЕРХ-МС, визначення загального Карбону для забезпечення високої чутливості та селективності, у процесі здобуття точних значень концентрацій.

Для проведення тесту «Розчинення» використовували процедури та методи, відповідно до вимог ДФУ. Для визначення кореляцій *in vitro* та *in vivo* проводили порівняльні дослідження та узагальнювали результати клінічних досліджень, згідно вимог і процедур, наведених у ДФУ, Настанові МОЗ України з біоеквівалентності та Державної Фармакопеї США (USP). Статистичні обрахунки виконували з використанням програмного забезпечення Excel 2021 та математичного пакета MicroCal Origin (Origin Demo Free).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Теоретично обґрунтовано оригінальний підхід до проведення тесту «Розчинення» для біологічно активних речовин, що є важкорозчинними у водних середовищах, відповідно до вимог Настанови з проведення процедури біоверифікації та ДФУ, що забезпечує можливість такого дослідження для речовин 4 групи БСК.

Розроблено нову методику визначення межі розчинності кверцетину, із використанням ВЕРХ-МС у водному середовищі із нейтральним рН. Досліджено кінетику розчинення кверцетину у водному середовищі та проаналізовано дані, уперше розраховано кількісне значення межі розчинності методом взяття першої похідної для обраної математичної залежності.

Запропоновано оригінальний альтернативний метод для кількісного визначення межі розчинності важкорозчинних речовин, на прикладі кверцетину, заснований на вимірюванні концентрації загального органічного карбону в кислих розчинах з різним значенням рН та подальшою апроксимацією отриманої залежності значення рН рівного 7,0.

Розроблено методику кількісного визначення кверцетину в середовищах для проведення тесту «Розчинення» в діапазоні заданих концентрацій. Вперше отримано профілі розчинення кверцетину у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8, для препарату «Квертин» таблетки жувальні по 40 мг згідно до вимог БСК. Уперше проведено кореляційний аналіз даних *in vitro/ in vivo* для препарату «Квертин» за процедурою IVIVC.

Новизна та пріоритет дослідження підтверджено патентом України на корисну модель: пат. № 152115. «Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді».

**Практичне значення отриманих результатів.** Запропонований та експериментально підтверджений оригінальний підхід для проведення тесту «Розчинення» важкорозчинних у воді речовин може використовуватися під час фармацевтичної розробки твердих лікарських форм, а також для всіх завдань, що формулює Настанова з проведення біоквівалентності.

Метод встановлення межі розчинності для субстанцій, обмежено розчинних у воді речовин апробовано в умовах промислового підприємства та внесено до плану наукових розробок ФК «Здоров'я» на 2023-2024 рр. Аналітичну методику передано до департаменту фармацевтичної розробки ФК «Здоров'я» (акт впровадження від 17.08.2023).

Спосіб математичного розрахунку межі розчинності кверцетину за допомогою апроксимації даних математичною функцією поліному 2-го та 3-го порядку буде введено до національного тексту Державної Фармакопеї України (ДФУ) 2.7, Том 2, 5.3.N.3 «Забезпечення якості», та 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» (акт впровадження від 15.11.2023)

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено в науковий та навчальний процеси кафедр, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Запорізького державного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акти впровадження

від (21.11.2023, 30.11.2023, 07.09.2023 відповідно).

**Особистий внесок здобувача.** Під час виконання дисертаційної роботи авторкою спільно з науковим керівником розроблено дизайн дослідження, сформульовано основні вектори дослідження.

Дисертанткою самостійно проведено аналіз сучасних наукових джерел, обрано та обґрунтовано аналітичні методи, що були застосовані в процесі досліджень. Розроблено й апробовано методики кількісного визначення межі розчинності кверцетину у нейтральних та кислих середовищах, за допомогою методів ВЕРХ-МС та ТОС. Дисертанткою сформульовано нову систему критеріїв для вибору речовини-маркеру в рамках досліджень полікомпонентних препаратів, генеричних та оригінальних, що містять біоактивні речовини рослинного походження.

Дисертантка брала участь у плануванні та здійсненні досліджень з біоеквівалентності препаратів «Синупрет екстракт», «Синупрет-форте» та «Детралекс», «Препарат Д», до яких входило: підготовка зрізків, вивчення впливу рН, розробка методики визначення кверцетину, проведенні тестів «Розчинення», відповідно до вимог Настанови, ДФУ та БСК, аналізі зразків аналітичним методом ВЕРХ-МС, інтерпретації отриманих результатів та валідаційних процедурах. Самостійно здійснено дослідження щодо методології проведення кореляції *in vitro/in vivo* методом IVIVC, що описаний в Фармакопеї США (USP).

Розробку аналітичних методик кількісного визначення кверцетину у субстанції та лікарських засобах здійснювали на базі Навчально-наукового інституту прикладної фармації НФаУ за консультативної підтримки провідного фахівця, канд. тех. наук В. А. Ханіна. Для проведення кореляційних досліджень в роботі використано результати дослідження фармакокінетики препарату «Квертин», таблетки жувальні, проведені на кафедрі клінічної фармакології та клінічної фармації НФаУ під керівництвом проф. Зупанця І. А.

Персональний внесок здобувача в кожну з опублікованих праць зі співавторами зазначено в дисертації в списку фахових публікацій. Усі наукові узагальнення, результати, висновки та рекомендації, наведені в дисертації, опрацьовано та виконано автором особисто.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи представлено та обговорено на міжнародних науково-практичних конференціях: 10th International Pharmaceutical conference «Science and practice» (15 листопада 2019 р., м. Каунас, Литва), XI International scientific and practical conference «Implementation of modern scientific opinions in practice» (20-21 березня 2023 р., м. Більбао, Іспанія), XI International scientific and practical conference «Problems of the development of science and the view of society» (21-24 березня 2023 р., м. Грац, Австрія), International scientific and practical conference «Modern chemistry of medicines» (18 травня 2023 р., м. Харків, Україна), International scientific and practical conference «Безперевний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи» (01 листопада 2023 р., м. Харків, Україна), International scientific and practical conference «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (24 листопада 2023 р., м. Харків, Україна), International scientific and practical conference «X Innovate scientific research: theory and practice» (21-24 листопада 2023 р., м. Стокгольм, Швеція).

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 експериментальних розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 132 найменувань, з них 128 латиницею та 4 кирилицею. Обсяг основного тексту становить 113 сторінок. Роботу проілюстровано, 40 рисунками та 78 таблицями.

**РОЗДІЛ I**  
**ОГЛЯД СУЧАСНИХ ПІДХОДІВ ДО ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ**  
**РОЗЧИНЕННЯ РОСЛИННИХ КОМПОНЕНТІВ, ЗОКРЕМА, -**  
**КВЕРЦЕТИНУ**  
(Огляд літератури)

1.1 Сучасний стан і проблеми дослідження біоеквівалентності *in vitro*

Для підтвердження еквівалентності лікарських засобів у твердих дозованих формах системної дії для орального застосування можуть бути проведені дослідження *in vitro*. Прийняття рішення щодо реєстрації генеричного лікарського засобу без проведення досліджень біоеквівалентності *in vivo* на підставі досліджень *in vitro* відповідно до світової практики має назву проходження за процедурою "біовейвер" [1].

Підхід біовейверу, заснований на засадах БСК, спрямований на зменшення кількості досліджень біоеквівалентності *in vivo*, тобто його можна розглядати як заміну дослідженням біоеквівалентності *in vivo*. Дослідження біоеквівалентності *in vivo* не можуть проводитися, якщо припущення про еквівалентність *in vivo* можна обґрунтувати задовільними даними *in vitro*. Враховуючи велике значення клінічних досліджень, дуже важливо мати можливість проводити процедуру біовейверу на основі БСК як дослідження, що є етапом перед проведенням повномасштабних клінічних досліджень. Це особливо важливо для розробки та виробництва генеричних ліків, оскільки економія матеріалів, часу та людських ресурсів буде значною. Однак, згідно з класифікацією БСК, не можна проводити процедуру біовейверу для важкорозчинних речовин. Таким чином, для генеричних препаратів, що містять важкорозчинні речовини, неможливо встановити ідентичність оригіналу, що різко підвищує ризик отримання негативних результатів під час клінічних досліджень [1, 2].

Процедура біовейвера базується на БСК, яка дозволяє розділити всі діючі речовини на чотири класи відповідно до їх розчинності у водних розчинах і ступеня проникнення.

- клас I — висока розчинність, висока проникність;
- клас II — низька розчинність, висока проникність;
- клас III — висока розчинність, низька проникність;
- клас IV — низька розчинність, низька проникність.

Коли вищезазначені показники комбінують з розчиненням лікарського засобу, то система враховує три головні фактори: розчинення препарату, біофармацевтичну розчинність і ступінь проникнення діючої речовини [1].

Лікарські засоби IV класу мають низьку розчинність та низький коефіцієнт проникнення. Ці лікарські засоби мають труднощі з розчиненням та поглинанням організмом. До цього класу відносяться, наприклад, практично всі натуральні екстракти рослин, оскільки вони містять компоненти, які погано розчиняються у воді або інших розчинниках. Приналежність до 4 класу та фізико-хімічні властивості цих речовин створюють велику перешкоду на шляху вивчення цих речовин, оскільки дослідження можуть бути проведені лише *in vivo*, що різко дорожчає дослідження. Серед рослинних АФІ яскравим прикладом ліпофільних і як наслідок важкорозчинних у воді сполук є кверцетин. З цієї причини біодоступність кверцетину дуже часто невисока [3].

Дослідження мають гарантувати властивості негайного вивільнення і підтверджувати подібність між досліджуваними лікарськими засобами, тобто досліджуваний та референтний лікарські засоби мають показувати подібність розчинення *in vitro* при фізіологічно відповідних експериментальних умовах рН. Проте це не встановлює кореляцію *in vitro* / *in vivo* [1]. Розчинення *in vitro* має досліджуватися в діапазоні рН 1-6.8 (принаймні рН 1.2, 4.5 та 6.8). Додаткові дослідження можуть бути необхідними при значеннях рН, в яких діюча речовина

має мінімальну розчинність. Використання будь-яких поверхнево-активних речовин не є прийнятним [1].

Порівняльні дослідження розчинення *in vitro* мають відповідати діючим фармакопейним стандартам. Таким чином, необхідно надати детальний опис умов проведення експериментів і аналітичних методик, включаючи валідаційні дані [4].

У ході фармацевтичної розробки лікарського засобу тест «Розчинення» використовуються як спосіб ідентифікації факторів препарату, що впливають та можуть мати вирішальний вплив на біодоступність препарату. Після визначення складу і розробки виробничого процесу тест «Розчинення» використовуються для контролю якості серій, виготовлених при масштабуванні процесу, і промислових серій, щоб забезпечити як відтворюваність від серії до серії, так і те, що профілі розчинення залишаються подібними до серій, що використовувались в основних клінічних випробуваннях. Крім того, тести на розчинення в деяких випадках можуть використовуватися для відмови від проведення досліджень біоеквівалентності *in vivo*. Таким чином тест «Розчинення» може використовуватись для декількох цілей:

1) контроль якості продукту:

- для отримання інформації про серії досліджуваного лікарського засобу, що використовуються в дослідженнях біодоступності/біоеквівалентності та основних клінічних дослідженнях, для обґрунтування специфікацій контролю якості;
- для використання інструменту контролю якості, щоб продемонструвати відтворюваність у виробництві;
- для отримання інформації про референтний лікарський засіб, що використовується в дослідженнях біодоступності/біоеквівалентності та основних клінічних дослідженнях;

2) заміна досліджень біоеквівалентності:

- для демонстрації в деяких випадках подібності між різними складами препаратів та референтним лікарським засобом (відмова від проведення досліджень біоеквівалентності *in vivo*, наприклад, зміни, що можуть бути протягом дії реєстраційного посвідчення, зміни препарату під час розробки та зміни генеричних лікарських засобів; див. розділ 4.2 та Додаток III цієї настанови);
- для дослідження відтворюваності від серії до серії препарату (досліджуваного і референтного), що використовується як основа при виборі прийнятних серій для дослідження *in vivo* [1].

Крім того, тест «Розчинення» є чи не найголовнішим при розробці складу твердих лікарських форм у процесі фармацевтичної розробки.

Методики випробування мають бути розроблені стосовно препарату на загальних та/або спеціальних фармакопейних вимогах. Якщо такі вимоги є неприйнятними та/або не відображають кінетику розчинення *in vivo* (тобто біорелевантність), можуть бути розглянуті альтернативні методики, якщо обґрунтовано, що вони є дискримінаційними та дають змогу розрізнити серії з прийнятними і неприйнятними характеристиками препарату *in vivo*. Має завжди розглядатися поточний стан інформації, включаючи взаємодію характеристик отриманих на підставі БСК – класифікації та лікарської форми.

На сьогоднішній день у ДФУ відсутня можливість кількісної оцінки розчинності речовин, що створює велику проблему для виробників лікарських засобів, що містять важкорозчинні та практично нерозчинні речовини, оскільки кількісно оцінити їх розчинність, використовуючи лише суб'єктивні методи візуального дослідження, не є можливим. Фармакопеї провідних країн також не містять методів для кількісного визначення точного значення межі розчинності [4].



## 1.2 Оцінка біодоступності та біоактивності рослинних активних компонентів

В останні роки все більше людей звертається до використання рослинних препаратів для лікування та профілактики різноманітних захворювань. Важливість дослідження рослинних препаратів полягає в тому, що це дозволяє більш ефективно використовувати їх у медичній практиці, знизити ризики побічних ефектів та підвищити якість життя людей. Оцінка біодоступності та біозасвоєння компонентів, що входять до складу препаратів рослинного походження, важлива для розуміння механізмів дії цих компонентів та їх ефективності. Швидкість і ступінь поглинання можуть сильно відрізнятися між людьми. Міжіндивідуальна варіабельність біодоступності залежить від кількох ключових факторів, включаючи дієту, генетичне походження, склад кишкової мікробіоти та активність. Деякі біологічно активні харчові сполуки, такі як поліфеноли, відносно погано засвоюються, поглинання коливається від 0,3% до 43%, а циркулюючі плазмові концентрації їхніх метаболітів можуть бути низькими [5]. Обмежена біодоступність перешкоджає використанню біоактивних рослинних сполук як функціональних інгредієнтів [6]. Лише завдяки розумінню механізмів засвоєння цих речовин можна підвищити їхню біодоступність і таким чином реалізувати потенціал більшої користі для здоров'я.

Біодоступність, біоактивність і, як наслідок, вплив рослинних біологічно активних сполук на здоров'я залежать від їх молекулярної маси, хімічної структури, концентрації в їжі, а також від харчової матриці та шляхів травлення.

Після того, як вони вивільняються з харчової матриці та стають біодоступними, біоактивні харчові сполуки можуть засвоюватися в шлунково-кишковому тракті. На всмоктування цих сполук можуть впливати розчинність, взаємодія з іншими дієтичними інгредієнтами, молекулярні перетворення, різні клітинні транспортери, метаболізм і взаємодія з кишковою мікробіотою, що призводить до зміни їх біодоступності [7]. Різна розчинність ліпофільних і

гідрофільних сполук призводить до різних механізмів всмоктування [8]. Раніше вважалося, що харчові ліпіди проходять через кишкову стінку без змін, оскільки структурно подібні частинки ліпідів були знайдені як у кишечнику, так і в системному та лімфатичному кровообігу. Потрапляючи в ентероцит, жирні кислоти повторно етерифікуються моноацилгліцерилами з утворенням триацилгліцеринів перед секрецією в лімфатичну циркуляцію через збагачені триацилгліцерином ліпопротеїни, також звані хіломікронами [9]. На відміну від гідрофільних сполук, жиророзчинні сполуки не легко виводяться з нашого організму. Ліпіди або зберігаються в печінці, або повторно виділяються в кровообіг у вигляді ліпопротеїнів і далі зберігаються в жировій тканині.

Гідрофільні сполуки, такі як поліфеноли та більшість ліків, мають більш спрощений механізм всмоктування, ніж ліпіди. Більшість поліфенолів, які містяться в харчових продуктах, існують у вигляді етерів, глікозидів або полімерів, які не можуть засвоюватися як такі [6]. Ферментативний гідроліз відбувається з більшістю поліфенолів на щітковій облямівці епітеліальних клітин тонкої кишки. Це звільняє аглікони, який потім може потрапити в ентероцит. Аглікони також можуть вивільнитися в ентероциті шляхом цитозольного гідролізу, опосередкованого  $\beta$ -глюкозидазою [10]. В ентероцитах флавоноїдні аглікони можуть бути кон'юговані ферментами фази II, у результаті чого утворюються метильовані та/або глюкуронідовані форми. Деякі з метаболітів можуть повертатися з ентероцита в просвіт кишки за допомогою ABC-транспортерів [11]. Поглинені метаболіти, а також флавоноїди, які уникнули кон'югації в ентероцитах, проходять далі в гепатоцити через ворітну вену печінки, де відбувається подальша кон'югація. З печінки біоактивні метаболіти можуть виводитися або в системний кровоток, або з жовчю. Метаболіти поліфенолів, наявні в системному кровотоці, остаточно виводяться з сечею [12]. Оскільки велика частина поліфенолів і деякі більші молекули не всмоктуються в тонкому

кишківнику, ці сполуки досягають товстого кишківника, де вони метаболізуються мікробіотою в більш дрібні молекули.

Різниця та схожість між харчовими біологічно активними речовинами (ліпофільними та гідрофільними) та фармацевтичними препаратами щодо біодоступності наведено на рисунку 1.1. У сукупності метаболізм біологічно активних сполук харчових продуктів, як і у випадку з ліками, впливає на їхні фізичні та хімічні властивості, що робить їх більш розчинними у воді та легше виводиться наприкінці шляху біодоступності [12]. Цей процес, який також називають метаболічною детоксикацією, призводить до майже повної відсутності агліконів у системному кровотоці. Слід переглянути попередні думки про те, що аглікони були активними формами флавоноїдів, оскільки кон'юговані форми є тими, які, швидше за все, проявляють біологічну активність [13].

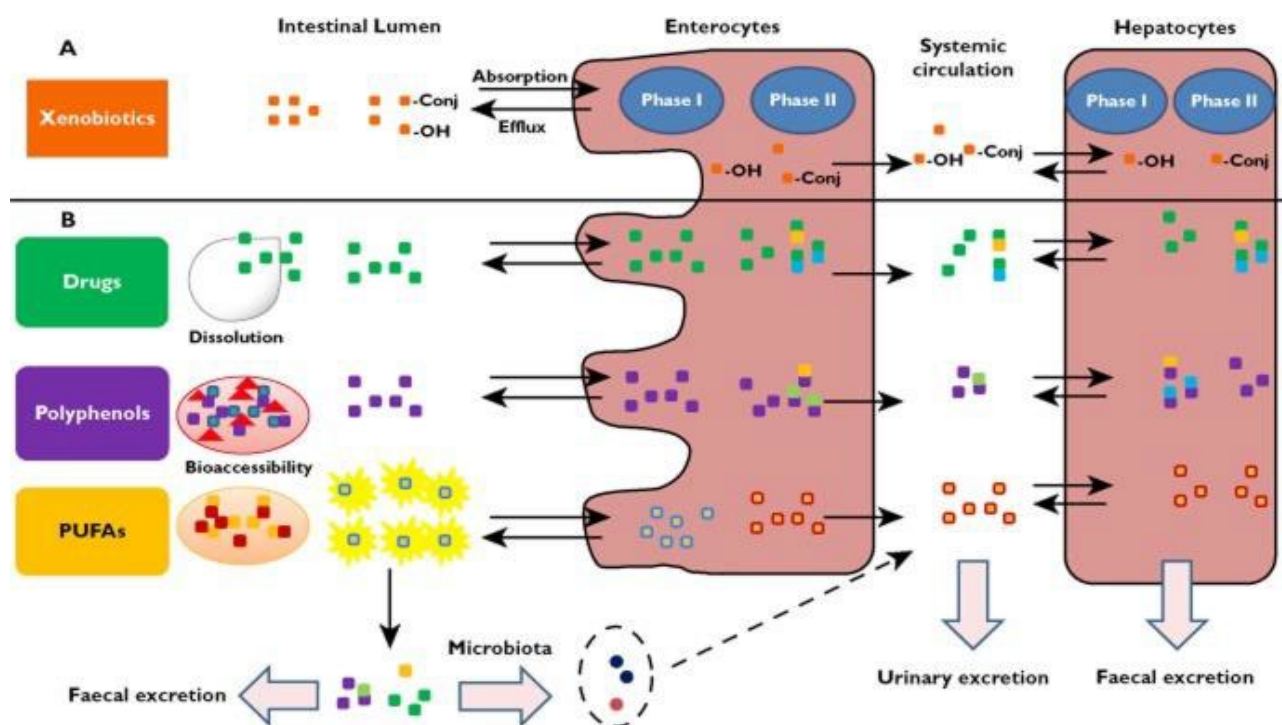


Рис.1.1 Порівняння біодоступності між харчовими, біологічно-активними речовинами та лікарськими препаратами [13]

### 1.3 Фактори, що потенційно впливають на біодоступність природних речовин

Молекулярна структура біоактивної сполуки істотно впливає на її всмоктування. Наприклад, добре відомо, що сполуки з високою молекулярною масою, такі як олігомерні проантоціанідини та складні ліпіди, не проходять через клітини кишківника, якщо їх спочатку не розщепити [14]. Крім того, було припущено, що цукрова частина флавоноїдів є важливою детермінантою в їх засвоєнні людьми [15]. Флавоноїди, пов'язані з  $\beta$ -глюкозидами, однією з найбільш домінуючих форм у природі, можуть дуже невеликою мірою всмоктуватися як такі та/або метаболізуватися ферментами (наприклад,  $\beta$ -глюкозидазами та лактазофлоризингідролазою) у тонкому кишечнику [12]. Однак, коли флавоноїди приєднуються до додаткового фрагмента рамнози, як у випадку з кверцетином із чаю, їм потрібно досягти товстого кишечника, щоб фрагменти цукру відщеплювались кишковою мікробіотою перед поглинанням [16].

Крім того, не тільки хімічна структура біоактивних харчових сполук, але й їх ізомерна конфігурація може впливати на їх засвоєння. Як і для деяких лікарських засобів, флавоноїди з різною стереохімією виявляють різну біодоступність і біоефективність. Це стосується біодоступності (-)-епікатехіну та (+)-катехіну [16], біодоступності цис-ізомерів і повністю транс-ізомерів лікопіну, біологічної активності (R/S) equol [17], а також для метаболізму (R/S) гесперидину [18, 19]. В останньому прикладі було виявлено, що співвідношення R : S ізомерів у зразках плазми та сечі людини гесперидин-7-глюкозиду становить 39 : 69, що свідчить про те, що S-конфігурація цього флавоноїду може бути більш біодоступною. Іншим прикладом є лікопін, біологічно активний каротиноїд з помідорів, який присутній у вигляді 95% повністю транс-ізомерів у помідорах, але цис-ізомери становлять близько 50% лікопіну в плазмі людини завдяки комбінації

ізомеризації в шлунково-кишковому тракті та більше біодоступність цис-ізомерів при проходженні через кишкову стінку [20, 21].

#### 1.4 Характеристика кверцетину та його місце серед флавоноїдів

##### 1.4.1 Загальна інформація

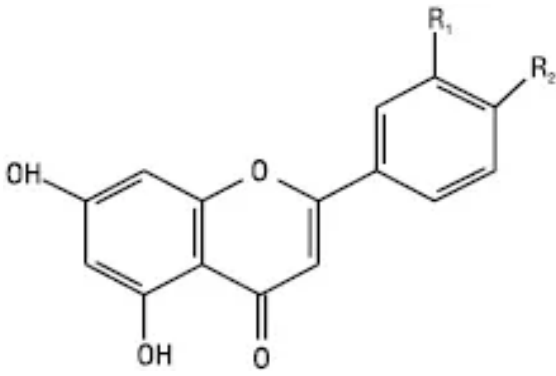
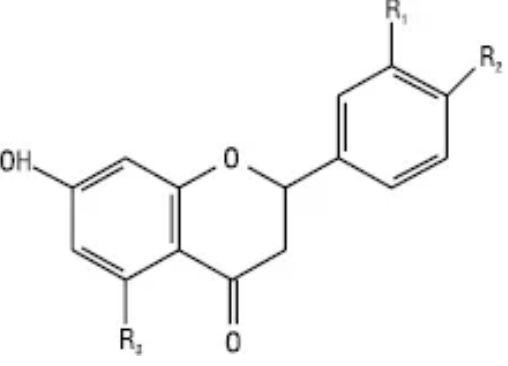
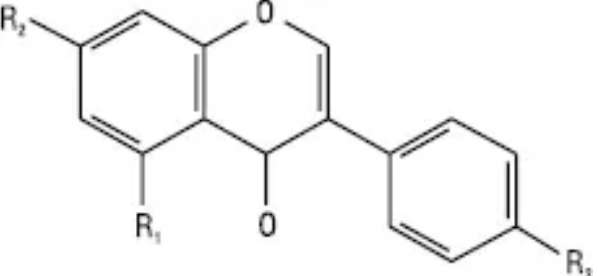
На сьогодні ідентифіковано понад 3000 різновидів флавоноїдів, і останнім часом вони викликають особливий інтерес через їхній потенційний позитивний вплив на здоров'я людини: противірусні, антиалергічні, антитромбоцитарні, протизапальні, протипухлинні, антиоксидантні властивості, а також лікування нейродегенеративних розладів [24]. За хімічною структурою флавоноїди поділяються на шість класів: флавоноли, флавони, флаванони, ізофлаволи, флаванолі та антоціанідини (таб. 1.1).

Таблиця 1.1

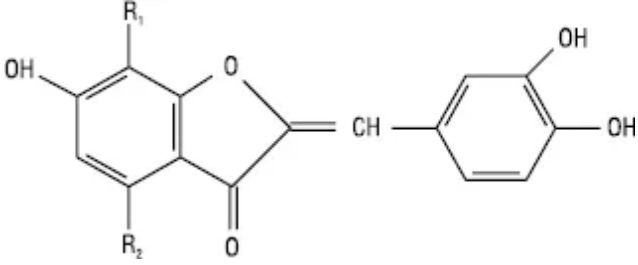
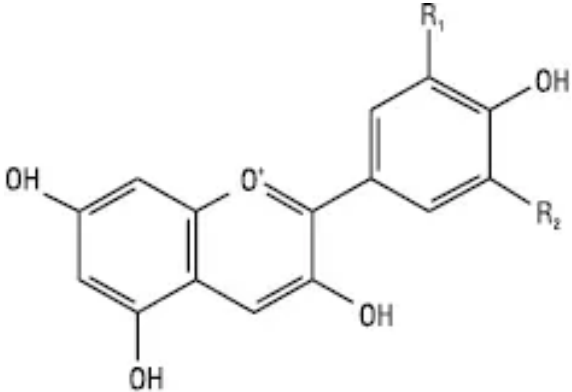
#### Основні класи та підкласи найбільш розповсюджених флавоноїдів

Флавоноли (цибуля, брокколи, чорниця, червоне вино, чорний чай)	
Хімічна речовина	Хімічна формула
1	2
Кемпферол <i>Кверцетин</i> Ізорамнетин Мірицетин Рамнетин	
Флавони (ароматні трави – петрушка, селера, часник, зелений перець, ромашковий чай, деякі злаки – пшоно і пшениця)	

Продовження Таб. 1.1

1	2
<p>Хризин Апігенін Акацетин Лютеолін Хризоеріол <i>Діосметин(Діосмін)</i></p>	 <p>The diagram shows the chemical structure of a flavanone. It consists of a chromone core (a benzene ring fused to a pyrone ring) with a hydroxyl group (-OH) at the 5-position. At the 3-position of the pyrone ring, there is a phenyl ring substituted with two groups, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>.</p>
<p>Флаванони (томати, цитрусові – апельсин, лимон, мандарин та ін., м'ята)</p>	
<p>Ліквіритигенін Нарингенін Еріодиктіол Гомоеридиктіол <i>Гесперидин</i></p>	 <p>The diagram shows the chemical structure of an isoflavanone. It features a chromone core with a hydroxyl group (-OH) at the 5-position. At the 3-position of the pyrone ring, there is a phenyl ring substituted with two groups, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>. Additionally, there is a substituent R<sub>3</sub> at the 7-position of the benzene ring of the chromone core.</p>
<p>Ізофлавонони (соя, бобові рослини)</p>	
<p>Геністеїн Формонетин Прунетин Біоханін Ізоформонетин</p>	 <p>The diagram shows the chemical structure of an isoflavone. It consists of a chromone core with a hydroxyl group (-OH) at the 5-position. At the 3-position of the pyrone ring, there is a phenyl ring substituted with a group R<sub>3</sub>. The chromone core has substituents R<sub>1</sub> at the 7-position and R<sub>2</sub> at the 8-position.</p>
<p>Аурони (червоні та жовті фрукти, овочі)</p>	

Продовження Таб. 1.1

1	2
Сульфуретин Ауреузидин Лептозидин	
Антоціанідини (червоне вино, деякі фрукти та злакові, фрукти, коренеплоди)	
Пеларгонідин Ціанідин Дельфінідин Пеонідин Мальвідин Петунідин	

Усі флавоноїди містять 15 атомів карбону в основному скелеті, які розподілені у вигляді двох шестичленних кілець і однієї тривуглецевої одиниці, пов'язаної з ними як С6-С3-С6 [24]. 3-Карбонова одиниця, що з'єднує фенільні групи, зазвичай циклізується з киснем з утворенням третього кільця. Ця структура ядра називається 2-фенілбензопіраноном [25]. Флавоноїди найчастіше асоціюються з цукром у кон'югованій формі як О-глікозиди або С-глікозиди. Вони також можуть існувати у вигляді агліконів [26]. Глікозиди зазвичай приєднані до позиції 3 або 7, причому найпоширенішими вуглеводами, які займають ці позиції, є D-глюкоза, L-рамноза, глюко-рамноза, галактоза або арабіноза. Інші фактори, що відносяться до різноманітної хімічної природи флавоноїдів, включають моделі

гідроксилування, сполучення між ароматичними кільцями, метоксигрупами та іншими замісниками, такими як сульфати та пренілові групи. Відомо, що флавоноїди демонструють широкий спектр фармакологічних і біохімічних реакцій, пов'язаних зі зміцненням здоров'я. Прикладами таких терапевтичних властивостей є протизапальні, гепатопротекторні, антимуутагенні, антиоксидантні, протипухлинні, противірусні, протимікробні, протигельмінтні, протиалергічні, протитромботичні, диференціювання та апоптотичні ефекти [27, 28].

Кверцетин (2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4-хромен-4-он, рис. 1.2) класифікується як флавонол, який є однією з шести підкатегорій флавоноїдних сполук і є основним поліфенольним флавоноїдом, який міститься в різних овочах і фруктах. Він має жовтий колір і повністю розчинний у ліпідах і спирті, нерозчинний у холодній воді, помірно розчинний у гарячій воді [3].

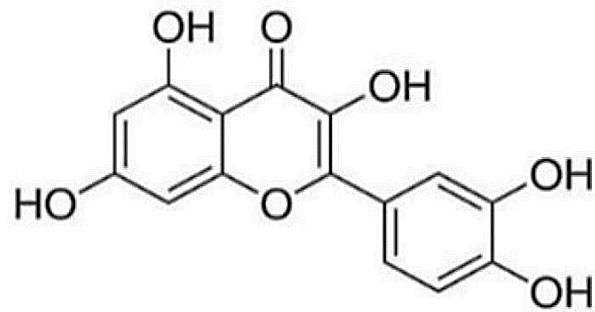


Рис. 1.2 Хімічна структура кверцетину

#### 1.4.2 Фармакотерапевтичні ефекти кверцетину

Деякі з корисних ефектів кверцетину включають захист серцево-судинної системи, протиракову, протипухлинну, противиразкову, протиалергічну, антивірусну, протизапальну, антидіабетичну, гастропротекторну дію, антигіпертензивну, імуномодулюючу та антиінфекційну активність [29]. Він також продемонстрував широкий спектр протиракових властивостей, і кілька звітів вказують на його ефективність як засобу для запобігання раку. Кверцетин



також має психостимулюючі властивості і, як було задокументовано, запобігає агрегації тромбоцитів, проникності капілярів і перекисному окисленню ліпідів, а також посилює мітохондріальний біогенез [30].

Нейропротекторний ефект кверцетину зумовлений головним чином його антиоксидантною здатністю та здатністю вловлювати вільні радикали. Добавки кверцетину можуть впливати на мітохондріальний біогенез, виробництво енергії та продуктивність ланцюга транспорту електронів, модифікацію виробництва АФК та мітохондріальні дефекти. Він також може проходити через гематоенцефалічний бар'єр [31-32].

Кверцетин разом з аскорбіновою кислотою зменшує частоту окисного пошкодження людських лімфоцитів і нервово-судинних структур шкіри та пригнічує пошкодження нейронів. Вважається, що флавоноїди відіграють вирішальну роль у захисті пошкодження нейронів [33]. Флавоноїди проявляють нейропротекторну дію в мозку, включаючи потенціал для захисту нейронів від пошкоджень, викликаних нейротоксинами. Він також має додаткову здатність пригнічувати нейрозапалення та підтримує когнітивні функції. Також виявлено, що флавоноїди демонструють захисні властивості, здатні запобігати більш серйозним дегенеративним захворюванням і багатьом формам цереброваскулярних захворювань, пов'язаних із деменцією та інсультом, які вражають переважно людей похилого віку [34]. Рослина або харчова добавка, багата флавоноїдами, покращує когнітивні функції та захищає вразливі нейрони шляхом посилення існуючої функції нейронів або стимулювання регенерації нейронів [35,36].

Вільні радикали є одним із ключових факторів розвитку таких захворювань, як гіпертонія, судинні розлади та метаболічний синдром.

Активні форми кисню (АФК) є неминучими продуктами клітинного окисного метаболізму і, як правило, підтримуються в стані балансу між прооксидантною та антиоксидантною активністю [37].

Однак багато подразників навколишнього середовища, включаючи термічні фактори, фактори росту та UV, можуть викликати надмірну АФК, порушуючи окисно-відновний баланс і спонукаючи клітини переходити в стан окислювального стресу. Шкіра людини є найбільшим органом тіла, який може протистояти будь-якому впливу навколишнього середовища. Однак УФВ викликає тимчасове збільшення АФК і дисбаланс ендогенних антиоксидантних систем, тим самим підвищуючи рівень вільних радикалів і запалення, які впливають на клітинні процеси.

Окислювальний стрес спричинений дисбалансом між оксидантами та антиоксидантами в організмі, і він має тенденцію до окислення. Після окислення це призводить до запальної інфільтрації нейтрофілів, високої секреції протеази та інших проміжних продуктів окислення. Окислювальний стрес може призвести до необоротного пошкодження клітинної ДНК, ліпідів або білків, що призведе до серйозних наслідків, таких як загибель клітин, канцерогенез і старіння [38].

Ефективною стратегією зменшення окислювального стресу у людей є збільшення споживання антиоксидантних фітохімічних речовин [39]. Кверцетин, природний поліфенольний флавоноїд, що міститься у фруктах і овочах, має значну антиоксидантну активність, оскільки пригнічує окислювальний стрес, тим самим запобігаючи пошкодженню антиоксидантів, тоді як більшість комерційно доступних синтетичних антиоксидантів є токсичними [40-41]. Вважається, що кверцетин здатний очищати АФК і підвищувати активність антиоксидантних ферментів, таких як рівні каталази (CAT) і глутатіонпероксидази (GPx) [42].

Кверцетин пригнічує окислювальний стрес, регулюючи баланс між окислювальним і антиоксидантним ефектами. У різних експериментальних дослідженнях кверцетин пригнічував радіаційно-індуковане пошкодження мозку у щурів, окислювальне пошкодження у щурів, викликане акриламідом, пошкодження нервів у сітківці щурів з діабетом, а також нейродегенеративні захворювання та окислювальний стрес, викликані фторидом кадмію. Модулюючи

рівень антиоксидантів, кверцетин захищає мозок, нерви та інші клітини в організмі від пошкоджень, спричинених окисленням [43, 44, 45]. Біофлавоноїди діють як відновники для водню або електронних агентів, які пригнічують або зменшують токсичність вільних радикалів і посилюють антиоксидантні властивості в організмі, тим самим забезпечуючи захист від радіації [46, 47, 48].

Кверцетин виявляє антиоксидантну та гепатопротекторну дію проти гострого ураження печінки у мишей, викликаного третинним бутилпероксидом водню. Це пояснюється його сильним антиоксидантним ефектом і ефектом поглинання вільних радикалів. Він пригнічує перекисне окислення ліпідів і підвищує антиоксидантну активність і, таким чином, може бути ефективним засобом лікування окисного ураження печінки [49]. Було виявлено, що кверцетин безпосередньо видаляє АФК і гідроксильні радикали в умовах гіпоксії та відновлює ендогенний окислювально-відновний гомеостаз шляхом підвищення рівня глутатіону та видалення ферментних систем вільних радикалів. Таким чином, він усуває спричинене гіпоксією порушення пам'яті шляхом зменшення спричиненої окислювальним стресом нейродегенерації в гіпокампі [50]. Крім того, він також пригнічує рухливість клітинної мембрани та деполаризацію мембрани мітохондрій. Таким чином, споживання кверцетину використовується для запобігання пошкодженню шкіри, спричиненому УФВ [51].

Кверцетин продемонстрував противірусну дію щодо широкого спектру вірусів. Наприклад, документально підтверджено ефективність кверцетину проти Т-лімфотропного вірусу людини 1, а також вірусу японського енцефаліту (JEV), викликаного японським енцефалітом, хворобою, що передається комарами [52]. Крім того, повідомлялося, що кверцетин пригнічує вірус Денге типу 2 і вірус гепатиту С, пригнічуючи активність протеази неструктурного протеїну 3 [53, 54]. Повідомлялося про ефективність інших препаратів кверцетину, таких як кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкуронід, збагачені кверцетином лецитинові препарати та кверцетин 7-рамнозид проти вірусу епідемічної діареї свиней та вірусу грипу А

відповідно [55-56]. Декілька досліджень було проведено для вивчення ефекту кверцетину на вірус COVID-19, який представив особливу небезпеку в останні роки і став причиною однієї з найбільших пандемій. В одному дослідженні, опублікованому в журналі *Nutrients* у 2020 році, було виявлено, що кверцетин може зменшити продукцію цитокінів, які сприяють розвитку запалення в легенях, що може бути корисним для лікування COVID-19 [57]. Кверцетин був запропонований як засіб для лікування ідіопатичного легеневого фіброзу (ІЛФ) завдяки його здатності відновлювати окисно-відновний баланс легень і пригнічувати запалення [58]. Кверцетин запобігає гострому пошкодженню легенів шляхом зниження рівня маркерів окисного стресу та підвищення активності антиоксидантних ферментів [59].

Кверцетин проявляє сильну бактеріостатичну активність щодо різних штамів бактерій, таких як *Salmonella enterica* серотипу *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Yersiniacoccus ia coli*, які були більш ефективні проти грампозитивних, ніж проти грамнегативних бактерій [60]. Дослідження Джасінгхані [61] також повідомили про його ефективність проти *Shigella flexeneri* NCIM5265 та *Lactobacillus casei var Shirota*. Вражає, що Осонга та ін. [62] документально підтвердили, що похідні кверцетину (наприклад, кверцетин 4',5-дифосфат (QDP), кверцетин 3',4',3,5,7-пентафосфат (QPP), кверцетин 5'-сульфонова кислота (QSA) ) приводять до володіє високою біосумісністю, розчинністю та потужною антибактеріальною активністю зі 100% інгібуванням *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Aeromonas Hydrophila*. Більш того, кверцетин виявив сильну протигрибкову активність щодо *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* та *Aspergillus niger* [63].

Завдяки своїй антиоксидантній активності кверцетин має терапевтичний ефект при серцево-судинних захворюваннях. Наприклад, ішемічна хвороба серця може призвести до гострого інфаркту міокарда (ГІМ). Нещодавнє дослідження

показало, що окислювальний стрес є важливим фактором, який бере участь у розвитку ГІМ. Кверцетин регулює протизапальні та антиапоптозні процеси для ефективного захисту від пошкодження міокарда [64]. Крім того, кверцетин захищає серце від вторинної серцевої дисфункції через окислювальний стрес і запалення. Кверцетин значно послаблює надлишок АФК, зменшує пошкодження, викликане травмою, підвищує фактор некрозу пухлини (TNF- $\alpha$ ) та запобігає пошкодженню клітин міокарда, спричиненому перевантаженням  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким чином, кверцетин може ефективно запобігати травмам, спричиненим окисним стресом [65].

Кверцетин використовується для профілактики раку та для запобігання поширенню різних видів раку, таких як рак легенів, простати, печінки, молочної залози, товстої кишки та шийки матки. Його протипухлинні властивості опосередковуються різними механізмами, що включають клітинні сигнальні шляхи та ферментативну активність, яка пригнічує канцерогени. Кверцетин запобігає розвитку раку, посилюючи білок p53, який є найпоширенішим інактивованим супресором пухлин [66-67]. Крім того, кверцетин запобігає раку шляхом модуляції маркерів окисного стресу та антиоксидантних ферментів. У попередньому дослідженні у щурів вивчали гістологічні зразки та маркери окисного стресу, такі як перекисне окислення ліпідів (ПОЛ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  та рівень антиоксидантного глутатіону. Результати показали, що щури, які отримували канцероген і тестостерон, мали вищі рівні ПОЛ і  $\text{H}_2\text{O}_2$  і нижчі рівні глутатіону порівняно з щурами, які отримували кверцетин. Це означає, що кверцетин можна використовувати для націлювання на сигнальні молекули при раку передміхурової залози, який є другою за величиною причиною смертності чоловіків від раку [68].

Депресія – поширене психічне захворювання, яке негативно впливає на фізичне та психічне здоров'я людини. Хронічний стрес пов'язаний з депресією і тривогою. Кілька досліджень показали, що лікування кверцетином значно знижує окислювальний і запальний стрес і запобігає нервовому пошкодженню шляхом

регулювання маркерів окислювального стресу, таких як реактивні речовини тіобарбітурової кислоти (TBARS) і оксид азоту, антиоксидантів, таких як загальний тіол і каталаза, і прозапальних цитокінів в гіпокампі [69]. В іншому місці було показано, що кверцетин має значний антидепресивний ефект при нюховій бульбектомії, тваринній моделі депресії. У тесті на примусове плавання та тесті на підвішуванні хвоста кверцетин зменшив час нерухомості, збільшив час, витрачений на догляд, і збільшив активність супероксиддисмутази і вміст гідропероксиду ліпідів у гіпокампі, таким чином забезпечуючи антидепресивну дію [70]. Ці результати вказують на те, що кверцетин запобігає стресу, викликаному неврологічними ускладненнями, і підвищує загальну антиоксидантну активність в організмі.

#### 1.4.3 Біодоступність кверцетину

Розчинність кверцетину у воді дуже низька, що опосередковано або прямо призводить до низької біодоступності кверцетину в організмі людини, навіть нижче 1% [71].

Попередні дослідження на тваринах і людях повідомляли про погану пероральну біодоступність кверцетину після одноразової пероральної дози через поглинання макроелементів [72]. Наприклад, коли кверцетин потрапляє в організм у формі глікозидів, глікозильні групи вивільняються під час жування, травлення та всмоктування. Після цього глікозиди кверцетину перетворюються в аглікони в кишечнику, перш ніж вони всмоктуються в ентероцити під дією ферментів  $\beta$ -глікозидаз. За даними Вале та ін. [73], попередні дослідження показали, що в цьому ферментативному гідролізі беруть участь кишкові та ротові бактерії. Кверцетин є ліпофільною сполукою, тому передбачається, що він може проникати через кишкові мембрани шляхом простої дифузії, і теоретично це всмоктування краще, ніж його глікозидної форми, які досягають кишечника без деградації [74].

На сьогоднішній день було проведено ряд досліджень біодоступності глікозидів кверцетину, отриманих з різних видів тварин. Наприклад, глікозиди кверцетину з цибулі поглиналися пацієнтами з ілеостомою у більшому відсотку, ніж чистий агліккон, про що повідомляли Голман та ін. [75, 76] задокументували існування значної кількості агліккону в ілеостомній рідині, взятій у пацієнтів з ілеостомою, які їли їжу з цибулею. Вони також повідомили про наявність великої кількості глікозидів кверцетину та невеликої кількості агліккону кверцетину в рідині, але глікозиди кверцетину в ній не спостерігалися. Одним із можливих пояснень є те, що відбувається гідроліз глікозидів кверцетину, коли він перетворюється ферментами  $\beta$ -глікозидази на агліккон. Ці ферменти містяться в тонкому кишечнику, і більшість з них потім всмоктується. Феррі та ін. [77] вивчали фармакокінетичні властивості внутрішньовенної ін'єкції кверцетину хворим на рак у дозах 60–2000 мг/м<sup>2</sup>. Вони визначили, що 945 мг/м<sup>2</sup> є безпечною дозою кверцетину, тоді як його токсична доза, як повідомляється, викликає блювання, гіпертензію, нефротоксичність і зниження рівня калію в сироватці крові. Встановлено, що період розподілу та напіввиведення кверцетину при внутрішньовенному введенні становив 0,7–7,8 хв та 3,8–86 хв відповідно, тоді як його кліренс та об'єм розподілу становили 0,23–0,84 л/хв/м<sup>2</sup> та 3,7 л/м<sup>2</sup> відповідно. Ерлунд та ін. [78] досліджували фармакокінетичні властивості 8, 20 і 500 мг кверцетину агліккону перорально у здорових учасників. Граефе та ін. [79] також вивчали фармакокінетичні властивості кверцетину та підтримували рівень дози до 200 мг і продемонстрували, що  $C_{\max}$  і  $T_{\max}$  кверцетину становили  $2,3 \pm 1,5$  мкг/мл і  $0,7 \pm 0,3$  години відповідно.

#### 1.4.4 Оцінка проникності кверцетину крізь мембрани людського організму

Оцінка проникності переважно повинна ґрунтуватися на ступені абсорбції, отриманому за результатами фармакокінетичних досліджень людини, наприклад,

абсолютна біодоступність або баланс маси. Про високу проникність можна зробити висновок, коли абсолютна біодоступність становить  $\geq 85\%$ . Про високу проникність також можна зробити висновок, якщо  $\geq 85\%$  введеної дози виявляється в сечі у незміненому вигляді (вихідний препарат) або як сума вихідного препарату, окислювальних метаболітів фази 1 та кон'югативних метаболітів фази 2 [1].

Вважається, що кверцетин має дуже низьку біодоступність. Більшість досліджень флавоноїдів, аналогів кверцетину, таких як рутин (кверцетин-3-О-рутинозид), пояснюють дві причини такої поганої біодоступності: швидкий метаболізм кверцетину при першому проходженні в організмі та низьку розчинність у воді [80]. В одному дослідженні повідомлялося, що лише  $< 1\%$  незміненого QUE всмоктується у шлунково-кишковому тракті [81], в той час, як інші дослідження повідомляють про значне зниження фармакологічної активності метаболітів порівняно з його агліконовою формою (що забезпечує підвищену розчинність у воді) [82]. Кверцетин вводили щурам внутрішньовенно (33 мкмоль/кг) і перорально (165 мкмоль/кг), тоді як рутин вводили перорально (328 мкмоль/кг). Результати показали, що після внутрішньовенного введення кверцетину 93,8% дози циркулювало у вигляді його сульфатів та глюкуронідів. Після перорального прийому кверцетину в кровотоку були наявні виключно глюкуроніди та сульфати кверектину, тоді як вихідна форма кверцетину не виявлялася. Швидкість пероральної абсорбції кверцетину склала 53% у порівнянні з внутрішньовенним введенням після корекції дози. При пероральному прийомі рутину в кровотоку були присутні виключно сульфати та глюкуроніди кверцетину, тоді як рутин та кверцетин не виявляли [83].

Система БСК [84] є корисним посібником для класифікації молекул лікарських засобів на основі їх властивостей розчинності та проникності. АФІ, класифіковані таким чином, проходять різні етапи попередньої перевірки з метою покращення їхньої біодоступності. При розчинності у воді близько 20 мкг/мл



кверцетин практично нерозчинний і врівноважується у воді у вигляді кверцетину дигідрату ( $QUE \cdot 2H_2O$ ) [85]. Отже, кверцетин був віднесений до молекул класів БСК II [86] та IV [87]. Хоча кверцетин можна віднести або до класу БСК II або до класу IV, номенклатура БСК може бути непридатною для таких нутрицевтиків, як кверцетин. Деякі дослідники [88] припускають, що кверцетин відповідає порогу високої проникності, оскільки його біодоступність становить  $\ll 85\%$  (тобто БСК IV). Однак одне дослідження виявило, що  $P_{app}$  становить 10-5 см/с для кверцетин, що дозволяє його класифікувати як речовину класу БСК II [89]. Так Лундом та ін. було проведено експеримент, в якому при одноразовому застосуванні кверцетин показав найбільшу проникність ( $P_{app} \times 10^{-6}$ , см/с) ( $10,09 \pm 0,77$ ). Кверцетин не отримав будь-якої істотної користі від комбінації, але показав найвищу проникність у поєднанні з ресвератролом ( $11,90 \pm 0,52$ ) та найнижчу у поєднанні з ресвератролом, куркуміном та піперинном ( $8,89 \pm 0,40$ ) [89].

Хоча поточні рекомендації припускають, що біодоступність лікарського засобу може використовуватися як заміна (а іноді й краще) проникності через великі міжлабораторні відмінності в традиційних моделях CaCo-2 [187], використання біодоступності у цьому контексті може виключити необхідність покращення біодоступності квеоцетину за рахунок підвищення розчинності у воді. Ще одним семантичним моментом є те, що важко помістити розчинність нутрицевтиків, таких як кверцетин, у контекст класів БСК, оскільки ми не знаємо, яка терапевтично ефективна доза. Це передбачає необхідність модифікованої структури розробки нутрицевтиків, розробки методів вивчення розчинності, або консенсусу за номенклатурою [90].

З вищенаведеного можна зробити висновок, що кверцетин володіє низькою проникністю крізь мембрани людського організму, а також ймовірно низькою, або дуже низькою розчинністю, що, безумовно, впливає на аспект проведення кореляції IVIVC (*in vitro/in vivo*).

#### 1.4.5 Шляхи покращення розчинності і біодоступності

Біодоступність низькорозчинної активної фармацевтичної речовини при пероральному прийомі залежить від швидкості розчинення лікарської форми. Тому було докладено багато зусиль для покращення розчинності та швидкості розчинення лікарських речовин, а саме шляхом модифікації фізичних властивостей інгредієнтів, додавання підсилювача розчинності, утворення нових сполук і системи твердої дисперсії [91].

Через погану розчинність у воді та низьку біодоступність (5,3%) кверцетину було проведено декілька досліджень для модифікації його структури для підвищення його розчинності у воді та біодоступності, а отже, для підвищення його антиоксидантної активності [92].

Процес модифікації кверцетину зазвичай поділяється на два типи, а саме: отримання кверцетину або рекомбінація з іншими активними групами. Перший змінює структуру кверцетину та покращує його розчинність шляхом дериватизації, а другий створює синергетичний ефект, заснований на властивостях активних груп і кверцетину, таких як металокомплекси кверцетину. Крім того, біоактивність і фармакологічна дія кверцетину значно посилюються після утворення комплексів з деякими металами або комплексними іонами. Тому багато дослідників намагалися покращити антиоксидантну активність кверцетину за допомогою методу комплексоутворення.

Було використано кілька підходів для доставки кверцетину через системи перорального введення, такі як ліпосомальні [93], рідкокристалічні [94], наночастинки [95], нанокристали [96], наночастинки твердих ліпідів [97]; або через систему місцевої доставки, таку як наносистеми на основі ліпідів [87], мікроемульсії води в маслі [98] та колагенові матриці [99].

Таким чином, стратегії, які покращують розчинність і біодоступність кверцетину, посилять його властивості, такі як його антиоксидантну та

протимікробну дію. Це сприятиме повному використанню кверцетину як багатого природного лікарського засобу для використання в медицині. Необхідно відзначити, що деякі перераховані вище методи дійсно дозволили підвищити розчинність кверцетину і як наслідок підвищили його біодоступність. Однак, значного прориву в даному аспекті так і не відбулося за всі роки активних досліджень як фармакологічних, так і фізико-хімічних властивостей кверцетину.

## Висновки до розділу 1

1. Огляд джерел літератури показав, що наразі іноземними науковцями поглиблено досліджується біологічно-активна речовина рослинного походження – кверцетин. Зокрема, шляхи покращення його розчинності в процесі розробки нових препаратів а також існуючих брендів і генеричних ЛЗ. Фармакологічні дослідження, які проводяться для кверцетину, демонструють його багатовекторну активність і можливість застосування для лікування великої кількості захворювань.

2. Оскільки точне значення межі розчинності кверцетину невідомо з літературних джерел, а вивчення біоеквівалентності та біодоступності обмежено через низьку розчинність у водному середовищі, то перспективним є проведення дослідження з вивчення кінетики вивільнення кверцетину в рамках фармацевтичної розробки нових генеричних та вивчення складу існуючих брендів лікарських засобів.

## РОЗДІЛ II

### МЕТОДОЛОГІЯ ДОСЛІДЖЕННЯ, ОБ'ЄКТИ, ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ

#### 2.1 Формування методології експерименту для визначення біодоступності кверцетину

Можливість визначення біодоступності речовин *in vitro* передбачає їх кількісне визначення відповідно до вимог Настанови [1]. В той же час кількісне визначення речовини вимагає повного розчинення цієї речовини, тобто утворення справжнього розчину. Саме тому вважають неможливим/некоректним проводити дослідження *in vitro* біодоступності важкорозчинних речовин (III, IV класи БСК), одним з прикладів яких є кверцетин. Для обґрунтування підходів щодо проведення такого експерименту слід визначити основні поняття, процеси, що відбуваються, та фактори, що впливають на ці процеси.

##### 2.1.1 Теорія розчинів і процесу розчинення

Справжні розчини зазвичай є термодинамічно стабільними системами, що складаються з розчиненої речовини, розчинника та продуктів їхньої взаємодії. Після взаємодії різного роду частинок розчинника та розчиненої речовини в справжньому розчині спостерігається рівновага, що характеризується мінімальним значенням енергії Гіббса.

Сучасна теорія розчинів розглядає процес утворення справжніх розчинів як багатостадійну сукупність фізико-хімічних явищ. Згідно до робіт Каблукова та Кістяковського [100] цей мимовільний процес можна описати за допомогою термодинамічних функцій та визначити три основні етапи. Кожен із цих етапів

характеризується зміною енергії системи, що супроводжується виділенням чи поглинанням тепла.

Як правило, процес розчинення речовини починається з руйнування хімічних та міжмолекулярних зв'язків, це потребує витрати енергії. Тому на цьому етапі спостерігається поглинання теплоти та зростання ентальпії. Наступний етап супроводжується хімічною взаємодією розчинника з частинками речовини. Внаслідок цієї взаємодії спостерігається утворення гідратів. Це призводить до виділення тепла у системі речовина-розчинник за рахунок виділення енергії. Ентальпія системи зменшується. Таким чином перші два етапи розчинення речовини обумовлені взаємодією речовини та розчинника, тобто природою взаємодіючих речовин. Незважаючи на те, що ця взаємодія носить мимовільний характер, але не є нескінченним процесом. Кількість зв'язків що утворюються в системі речовина - розчинник обмежена і, отже, процес має термодинамічні обмеження. Третім етапом розчинення речовини є дифузія гідратів, що утворилися, в об'ємі розчинника. Цей процес у кінцевому підсумку призводить до рівномірного розподілу гідратів у розчиннику. Оскільки цей процес вимагає витрати енергії, ентальпія системи знов зростає [100].

Таким чином, процес розчинення будь-якої речовини визначатиметься двома основними параметрами - термодинамічною та дифузійною складовими, а ефективність процесу розчинення легко оцінити за сумарним тепловим ефектом реакції.

### 2.1.2 Неоднозначність визначення розчинності в аналітичній хімії та фармакопейному аналізі

Здатність речовини рівномірно розподілятися по всьому об'єму розчинника у аналітичній хімії називається розчинністю. Показники розчинників наводяться у довідковій або науковій літературі. Натомість ДФУ під розчинністю мають на

увазі властивість речовини розчинятися у різних розчинниках. Відомості про розчинність лікарських речовин наводяться у фармакопейних статтях та довідкових таблицях. Для позначення розчинності речовин у фармакопеї використовується підхід, протилежний прийнятому в аналітичній хімії. В даному випадку наважка речовини є фіксованою величиною, що дорівнює 1,0 г, а об'єм розчинника величиною змінною [4].

Залежно від об'єму розчинника, використаного для розчинення 1,0 г досліджуваної речовини, згідно з прийнятою шкалою об'ємів, проводять градацію речовини за ступенем розчинності. Згідно до вимог фармакопеї, препарат вважають розчиненим, якщо в розчині при спостереженні в світлі, що проходить, не виявляються частинки речовини [4]. Ступінь розчинності залежно від обсягу використаного розчинника наведено у таблиці фармакопеї.

Такий підхід є якісною оцінкою розчинності речовини і не дозволяє отримати точні кількісні значення, виражені в одиницях концентрації речовини.

### 2.1.3. Аналіз факторів, що впливають на розчинність при дослідженні біодоступності

Можна виділити основні фактори, що впливають на розчинність речовин:

- Температура;
- Природа речовини та розчинника;
- Чистота речовини, що розчиняється;
- Наявність вологи в речовині, що розчиняється;
- Наявність перемішування;
- Площа поверхні контакту речовини та розчинника;
- Наявність достатньої кількості розчинника для розчинення всієї наважки речовини.

Розчинність може збільшуватися в залежності від природи речовини, що розчиняється, і розчинника, наявності в речовині сторонніх домішок, а також достатньої кількості вологи. Процес розчинення твердого тіла можна прискорити його подрібненням та ретельним перемішуванням з розчинником. Цим досягається велика площа контакту речовини, що розчиняється, з розчинником. Наявність перемішування також збільшує розчинність речовини.

Таким чином, задача збільшення розчинності речовин, мало розчинних у даному розчиннику, вимагала усунення всіх термодинамічних та дифузійних обмежень перерахованих вище.

Оскільки завданням нашого дослідження було вивчення розчинності кверцетину відповідно до вимог БСК а тесті «Розчинення» у цій роботі ми розглядали наведені вище фактори, що дозволяють забезпечити найбільш повне розчинення наважка кверцетину, що міститься в одній дозованій формі лікарського засобу.

Вимоги БСК до проведення біоетверу для препаратів, що вивчаються, містять стандартні умови описані в настанові СТ-Н МОЗУ 42-7.4:2022 «Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності» Додаток III Процедура біоетверу на підставі БСК :«Порівняльні дослідження розчинення *in vitro* мають відповідати діючим фармакопейним стандартам. [1, 4]. Звичайними умовами дослідження є:

- прилади: прилад із кошиком або прилад із лопаттю;
- об'єм середовища розчинення – 900 мл або менше;
- температура середовища розчинення –  $(37 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C})$ ;
- перемішування:
  - прилад із кошиком – як правило 100 об/хв;
  - прилад із лопаттю – як правило 50 об/хв;
- графік відбору проб: наприклад, 10, 15, 20, 30 і 45 хв;

- буфер: рН 1.0-1.2 (зазвичай 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої або штучний шлунковий сік без ферментів), рН 4,5 і рН 6.8 (або штучна кишкова рідина без ферментів); (необхідно забезпечити відповідний рівень рН протягом усього експерименту; рекомендовані буферні розчини описані в ЄФ або ДФУ N);
- інші умови: відсутність поверхнево-активних речовин; у разі желатинових капсул або таблеток з желатиновим покриттям може допускатися використання ферментів».

Аналіз наведених вище умов проведення біокейвера показує, що кількість чинників які можна використовуватиме збільшення розчинності кверцетину різко обмежений. Тип установки для проведення дослідження, температура середовища розчинення, об'єм середовища розчинення, швидкість перемішування і природа розчинника, що використовується, не змінюються при проведенні біокейверу.

З іншого боку, такі параметри як чистота речовини, що розчиняється, наявність вологи в речовині і площа поверхні контакту речовини і розчинника також мають бути величинами постійними, що дозволило б використовувати виміряну величину межі розчинності кверцетину для порівняння одержуваних результатів. Виконання цієї умови досягалося використанням кверцетину з чистотою не менше 99%, висушеного до постійної маси та подрібненого у стандартних умовах (розтирання у ступці) з подальшим контролем розміру частинок.

Таким чином, єдиним і головним фактором, що впливає на розчинність кверцетину в рамках проведення біокейверу, залишається наявність достатньої кількості розчинника для розчинення всієї наважки речовини.



#### 2.1.4 Проблеми визначення біодоступності кверцетину

Кверцетин згідно з фармакопейною класифікацією, відноситься до мало розчинних у воді речовин, отже об'єм розчинника необхідний для повного розчинення взятої для дослідження наважка (вимоги БСК-вивільнення не менше 85%) повинен бути досить великим і набагато перевищувати ємність склянки використовуваної в установці для проведення тесту «Розчинення» – 1000 мл.

Як один з шляхів вирішення подібної проблеми ДФУ пропонує метод проточної комірки. Але використання методу проточної комірки в даному випадку є ускладненим через технічні проблеми з дозуванням розчинника в систему і можливими втратами проби. Тому ми спробували перенести цей метод на відкриті ємності, що використовують в тесті «Розчинення».

Враховуючи наведені вище міркування, основним завданням дослідження є:

1. визначення необхідного об'єму розчинника;
2. реалізації схеми використання установки для проведення тесту «Розчинення» відповідно до вимог БСК.

#### 2.1.5 Обґрунтування методології

Перша проблема для свого вирішення вимагає знання точного значення величини межі розчинності кверцетину. Оскільки, межа розчинності – це концентрація насиченого розчину кверцетину, то знаючи її можна розрахувати об'єм розчинника, необхідний для розчинення всієї наважки кверцетину шляхом поділу кількості речовини у наважці кверцетину на величину межі розчинності. Одночасно при цьому буде вирішено проблему кількісного виміру межі розчинності кверцетину, оскільки літературні дані для кверцетину мали діапазон значень у п'ять порядків і не можуть бути використані для таких досліджень.

Друга проблема – недостатня ємність склянки для проведення тесту «Розчинення». Для процедури біоверифікації передбачено об'єм середовища 900 мл. Розділивши, раніше знайдений об'єм розчинника на 900, ми отримаємо кількість замінів розчинника в склянці установки для проведення тесту «Розчинення». Таким чином, попередньо встановивши час вивільнення кверцетину в 900 мл води в стандартних умовах проведення біоверифікації і провівши кількість вимірювань, що дорівнює знайдений кількості замінів розчинника, отримали набір значень концентрацій кверцетину в залежності від часу проведення аналізу. Послідовно підсумовуючи виміряні значення концентрацій кверцетину, будували криві вивільнення кверцетину в залежності від часу аналізу.

Незважаючи на те, що в даний час найбільш популярними методами для проведення тесту «Розчинення» є методи кошика і лопатки, обидва методи працюють в умовах закритої кінцевої ємності і не можуть забезпечити повний перехід таких речовин як кверцетин, у розчин. Запропонований нами підхід є новим, по суті, як модифікація застосування методу, описаного у фармакопеї, проточної комірки до стандартної установки з відкритими ємностями. Хоча спроби модифікації методу проточної комірки шляхом поєднання із відкритими ємностями у літературі відомі, але вони дають такіж результати як і апарати із закритим циклом, а швидкість розчинення досліджуваних речовин є однаковою, якщо дотримуватися вимогам проведення тесту «Розчинення» [101]. Гао та ін. довели у своєму дослідженні, що модифікований проточний апарат USP з конфігурацією з відкритим контуром демонструє потенціал кореляції з даними *in vivo*, але це може потенційно спрацювати із речовинами I класу БСК [101]. Для речовин IV класу БСК, -до яких належить кверцетин, - наведений метод то йому подібні не можуть бути використані, адже вони забезпечують повний перехід у розчин тільки речовин, для яких є характерною висока швидкість розчинності.

### 2.1.6 Етапи дослідження для експериментального підтвердження

- Встановити час, протягом якого наважка кверцетину буде повністю розчинятись
- Визначення межі розчинності кверцетину в водному середовищі:
- Дослідження впливу розміру часток на кінетику розчинення
- Розробка двох альтернативних методик для співставності результатів – ВЕРХ-МС та методу ТОС.
- Дослідження кінетики розчинення кверцетину
- Вимірювання кількісного значення межі розчинності
- Статистична обробка даних

### 2.1.7 Апробація підходу для вирішення різних задач

Для визначення можливих векторів використання запропонованого підходу для визначення біодоступності кверцетину заплановано апробацію даного підходу для різних задач:

#### 1) фармацевтична розробка

Як об'єкт дослідження було обрано лікарський засіб «Квертин» таблетки жувальні, по 40 мг 3 блістера по 10 шт. (виробництва «ПАТ НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ», Україна). Заплановано провести дослідження у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8, порівняти профілі розчинення та розрахувати фактор  $f_2$  та провести кореляційний аналіз одержаних даних кінетики вивільнення кверцетину із «Квертину» отриманих *in vitro* із даними, отриманими раніше *in vivo*.

#### 2) процедура біокейверу для дослідження лікарських засобів подібного складу (пролонгованої або посиленої дії)

Для демонстрації в деяких випадках подібності між різними складами препаратів та референтним лікарським засобом при реєстрації можлива відмова від проведення досліджень біоеквівалентності *in vivo*. Серед інших до такого випадку відносять зміни у складі лікарського засобу. Тому для апробації запропонованого підходу для вирішення подібної задачі нами заплановано, порівняльні дослідження в умовах тесту «Розчинення» оригінального лікарського засобу «Синупрет» екстракт №10 та «Синупрет-форте» таблетки №50, (виробництва Bionorica, Німеччина). На цьому етапі заплановано провести дослідження, у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8; порівняти профілі розчинення та розрахувати фактор  $f_2$ .

### 3) процедура біоверифікації для дослідження біоеквівалентності генеричного лікарського засобу

Для дослідження відтворюваності від серії до серії препарату (досліджуваного і референтного), було проведено порівняльні дослідження розчинення оригінального лікарського засобу «Детралекс» (Detralex®) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, виробництва «Серв'є» (Les Laboratoires Servier) Франція, та генеричний препарат вітчизняного виробництва, таблетки вкриті плівковою оболонкою, по 1000 мг, Україна; заплановано провести дослідження, у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8; порівняти профілі розчинення та розрахувати фактор  $f_2$ .

## 2.2 Уніфікація термінології для аналізу та стандартизації природних речовин

Вибір речовин-маркерів може проводитися із використанням різних критеріїв і в залежності від тієї аналітичної задачі, що ставиться в тій чи іншій роботі. Однак, зміст цих критеріїв в літературі не розкрито.

У цій роботі були сформульовані основні вимоги до активної речовини-маркеру з огляду на використану методику, виходячи з таких факторів:

- необхідно враховувати вимоги методу дослідження біодоступності ЛЗ;
- необхідно враховувати вимоги аналітичної методики, що використовується для кількісного визначення цієї речовини;
- обрана речовина має забезпечувати високий рівень релевантності отриманих результатів у процесі проведених досліджень по біодоступності.

Виходячи з наведених вище факторів, можна сформулювати перелік вимог до речовини-маркера, що є об'єктом дослідження у даній роботі:

- речовина має бути індивідуальною хімічною сполукою;
- речовина має обов'язково мати стехіометричну структуру;
- необхідно, щоб речовина мала CAS номер;
- речовина повинна мати фізико-хімічні властивості, близькі до основної групи речовин, що є об'єктом дослідження;
- речовина має бути досить стабільною у тих умовах, за якими проводиться аналіз;
- молекулярний іон повинен мати масу, доступну для визначення обраної аналітичної методикою;
- необхідно, щоб для цієї речовини існувало комерційно доступна речовина порівняння;
- необхідно, щоб речовина маркер належала до тих речовин, які надають описану біологічну дію;
- речовина має перебувати у досліджуваному препараті в доступній концентрації.

### 2.3 Обладнання та матеріали

Контрольно-вимірвальні прилади та допоміжне обладнання, що використовувалось у ході проведення дослідження (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Перелік контрольно-вимірювальних приладів та допоміжного обладнання**

Контрольно-вимірювальні прилади та допоміжне обладнання
Рідинний хроматограф Agilent 1290 Infinity II LC System с мас-селективним детектором Agilent 6530 «Agilent Technologies Inc.», програмне забезпечення - GPC/SEC Software for OpenLab CDS
Ваги аналітичні лабораторні електронні (АВТ 120-5DM)
рН-метр «STARTER ST 2100» фірми «OHAUS»
Напівавтоматична система для тестування розчинення «Pharmatest» тип РТ-DT 70 (відповідає вимогам загальної статті ДФУ 2.9.3. «Тест «Розчинення для твердих лікарських форм»)
Прилад лазерної дифракції моделі MALVERN MASTERSIZER 3000 (USA).
Аналізатор загального органічного карбону 450 TOC (METTLER TOLEDO), діапазон вимірюваних значень - 0.05–1000 ppb
Центрифуга лабораторна CM-3MT MICROmed на 24 проб, 4000 обертів/хв.
УЛЬТРАЗВУКОВА БАНЯ WUC-A03H, UOSLAB, Укросинтез
Мірний посуд 1 класу точності (клас точності А): мірні колби, піпетки

Всі застосовані реактиви, матеріали та стандартні зразки наведено у табл.2.2

Таблиця 2.2

## Перелік реактивів, матеріалів та стандартних зразків

Найменування	Назва виробника та номер серії
Кверцетин, субстанція (≥99%)	Порошок кверцетину, екстракт софори японської (Wuhan Recedar Biotechnology Co., Ltd)
Кверцетин, СЗ, (USP) (≥95%)	Quercetin (200 mg), (HPLC), solid Current Lot: R120F0 USP
Метанол (БЕРХ)	(Honeywell) H191B
Ацетонітрил (БЕРХ)	(Honeywell) H255M
Вода для хроматографії (БЕРХ_МС), (> 15 mΩ·cm [0.067 μS/cm])	(Millipore) 773185
Мурашина кислота (БЕРХ) (≥99%)	(Sigma-Aldrich) SZBF2290V
Розчин соляної кислоти, 0.1 М HCl (0.1N), (100%), endotoxin-free	(MilliporeSigma) 10037

Використані в дослідженнях лікарські засоби та їх склад наведено у відповідних розділах.

## 2.4 Обробка отриманих даних

Excel (Microsoft Office 2021) використовувався для розрахунку параметрів класифікаційних рівнянь та побудови графіків. математичного пакета MicroCal Origin (Origin Demo Free).

У якості програмних інструментальних засобів для фармакокінетичних досліджень було застосовано ліцензійне програмне забезпечення: MassLynx® 4.0 – TargetLynx® (Waters®), Microsoft Office Excel® 2003, WinNonlin Professional 5.2 (Pharsight Corporation). Оцінка фармакокінетичних параметрів проведена з використанням моделей розрахунків «NCA Model 200» та «NCA Model 201» WinNonlin Professional 5.2.

На основі отриманих первинних даних (площини піків), а також розрахованих показників (концентрації) були побудовані графічні залежності отриманих значень концентрації кверцетину від часу а також у вигляді таблиць.



### РОЗДІЛ ІІІ

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ЗНАЧЕННЯ МЕЖІ РОЗЧИННОСТІ КВЕРЦЕТИНУ

При формулюванні підходу ми виходили з того, що основними причинами, що обмежують розчинність кверцетину (як і інших малорозчинних речовин) у водному середовищі, є термодинамічні та дифузійні обмеження (розділ 2). Перший обмежує концентрацію кверцетину в розчині, а другий визначає кінетику процесу розчинення.

Таким чином, експеримент розділили на два етапи. У ході першого необхідно було встановити час, протягом якої наважка кверцетину - 6 мг, буде повністю переходити в розчин, щоб гарантувати максимальне наближення концентрації кверцетину в отриманому розчині до його рівноважної (псевдорівноважної) концентрації. Другий етап передбачає кількісне визначення концентрації кверцетину в розчині, що відповідає межі його розчинності.

Об'єм розчину визначають таким чином (1000 мл), щоб процес розчинення не мав термодинамічних обмежень та відповідав вимогам БСК. За умовами нашого експерименту для приготування досліджуваних розчинів ми брали зразок субстанції кверцетину, для якого значення вологості, вмісту речовини в речовині та ступеня подрібненості речовини характеризував виробник. Для цього зразок кверцетину перед використанням висушувався до постійної маси при 500°C у вакуумі. Загальний вміст супутніх домішок у кверцетині не перевищувало 0,2% (за даними сертифікату).

### 3.1. Вивчення впливу розміру часток кверцетину на кінетику розчинення

На повноту та час розчинення може мати вплив розмір часток. Оскільки наважка кверцетину перед приготуванням розчинів подрібнювалася (використовували стандартне розтирання у ступці), було проведено вимірювання розміру частинок, одержуваних після подрібнення. Для вимірювання використовували прилад лазерної дифракції моделі. Нижче наведено результати вимірювань (рис 3.1)

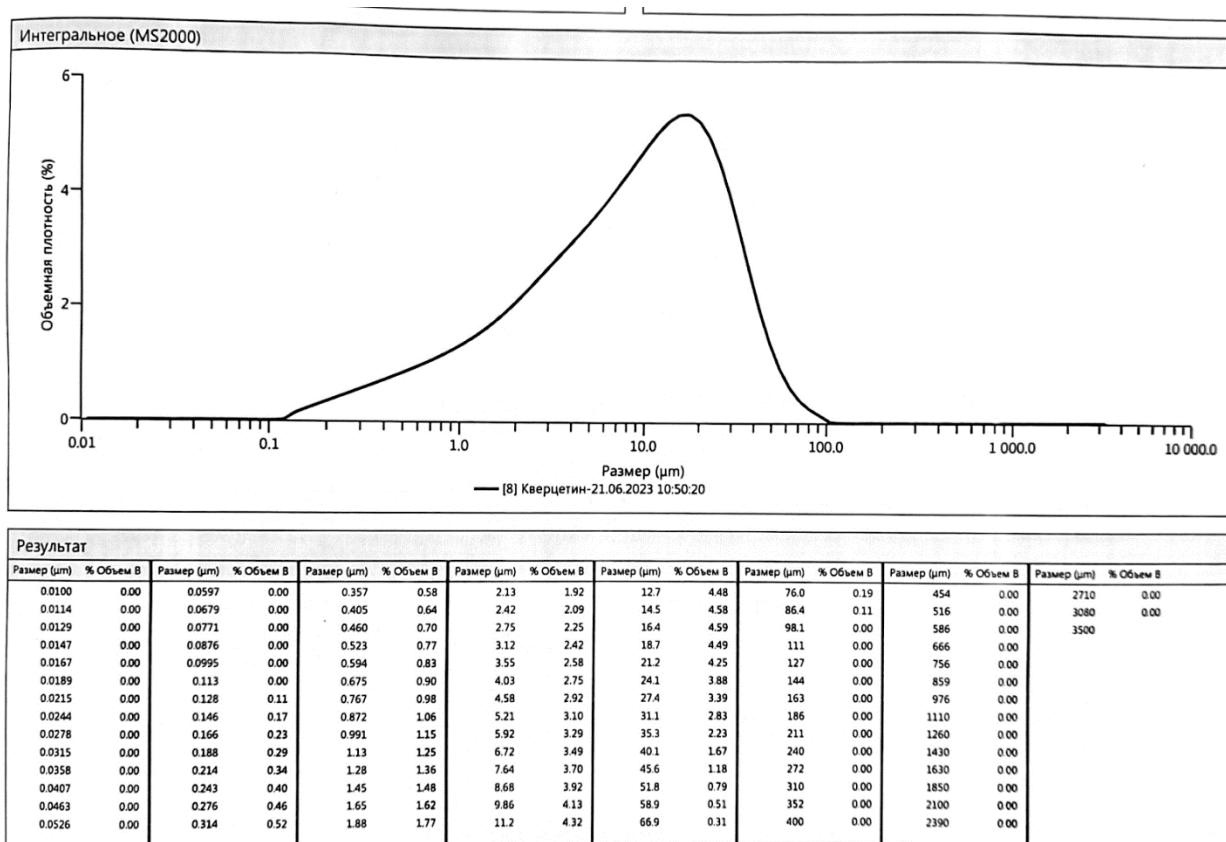


Рис. 3.1 Графік розподілу часток у зразку меленого кверцетину

Отримані результати показали, що переважна більшість частинок має розмір від 60 до 90 мкм.

Такий розмір часток дозволяє отримувати кінетику розчинення малорозчинних речовин при досягненні рівноважної (псевдорівноважної) концентрації кверцетину в розчині за проміжок часу 30-40 хвилин, відповідно до досліджень, що проводилися проф. Гризодубом. Таким чином, був обґрунтований вибір часу розчинення наважки кверцетину.

### 3.2 Конкретизація етапів дослідження межі розчинності кверцетину

У другому розділі ми обґрунтували основні етапи, що необхідні для визначення величини межі розчинності. Їх практична реалізація вимагає конкретизації та чіткого планування етапів таким чином:

а) Розробка методу кількісного визначення кверцетину у водних розчинах в діапазоні заданих концентрацій, що має достатню чутливість та селективність.

б) Дослідження кінетики розчинення кверцетину. Вимірювання часу розчинення та концентрації кверцетину при проведенні тесту на розчинення у водних розчинах. Отримання значення оптимального часу повного розчинення.

в) Вимірювання кількісного значення межі розчинності кверцетину у воді шляхом поступового розведення середовища розчинення та визначення концентрації кверцетину в залежності від ступеню збільшення об'єму розчину та побудова графічної залежності, що має характерний перегин. Концентрація у точці перегину відповідає межі розчинності кверцетину.

г) Визначення математичної моделі, що має описувати отримані експериментальні дані при рівні ймовірності 5%. Її статистичне обґрунтування для невеликих вибірок даних (менш 10).

д) Аналіз даних, отриманих за допомогою обраної математичної моделі, та розрахунку кількісного визначення межі розчинності кверцетину методом взяття першої похідної для обраної математичної залежності, що відповідає значенню точки перегину на кривій.

### 3.3 Визначення межі розчинності кверцетину методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією

Реалізація наведеного в попередньому розділі підходу до схеми вивчення кінетики вивільнення кверцетину вимагала розробки високочутливої та високоселективної методики визначення концентрації кверцетину в досліджуваних розчинах, оскільки вимірювані концентрації кверцетину знаходилися в діапазоні 0,01-1 ppm. Ця проблема була вирішена шляхом розробки ВЕРХ методики з використанням мас-селективної детекції, що дозволило визначати АФІ із заданою точністю та відтворюваністю.

#### 3.3.1 Хроматографічні умови методу ВЕРХ-МС

Для вимірювань використовували рідинний хроматограф Agilent 1290 з мас-спектрометричним детектором Agilent 6530 TOF, колонку 50 x 4,6 мм (Poroshell 120), заповнену сорбентом з прищепленою фазою октилсилікагелю (L1), розмір частинок – 1,7 мкм; з термостатичним регулюванням (30°C). Рухома фаза А: 0,1М розчин трифтороцтової кислоти, дегазований в ультразвуковій бані, рухома фаза В: ацетонітрил Р; об'єм введення – 10,0 мкл. Високоселективний часопротітний мас-спектрометр мав наступні налаштування: тип іонізації: позитивна, електророзпилювальна (+ESI); режим вимірювання: сканування в діапазоні мас 50-1500; напруга на фрагментаторі 10 В; температура азоту - 350°C; витрата азоту - 10 мл/хв; тиск на небулайзері 35 PSI; напруга на капілярі 4 кВ. Режим елюції: градієнтний (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

## Програма градієнту

t, хв	РФ А, %	РФ В, %
0	100	0
5	100	0
10	50	50
15	50	50
16	100	0
20	100	0

Розчин порівняння хроматографували, отримуючи від 2 до 6 хроматограм. Для площ піків кверцетину відносне стандартне відхилення (RSD) розраховується з отриманих хроматограм.

Отримання паралельних хроматограм ( $n_0$ ) припиняється, коли досягаються вимоги  $RSD_{max}$  для допуску змісту 15%, зазначені в таблиці 3.2:

Таблиця 3.2

## Вимоги до точності паралельних вимірювань

$n_0$	2	3	4	5	6
$RSD_{max}$	0.76	2.01	2.88	3.56	4.13

По 20 мкл кожного з досліджуваних розчинів і розчин порівняння хроматографують на рідинному хроматографі з кількістю хроматограм не менше, ніж при перевірці придатності хроматографічної системи.

Валідація методики визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі методом ВЕРХ-МС наведена у Додатку В.

### 3.3.2 Обробка отриманих даних

За отриманими результатами вимірювань методом зовнішнього стандарту розраховували концентрацію кверцетину для кожного досліджуваного розчину та будували графіки залежності концентрації кверцетину від об'єму розчину.

Отримана крива завжди представлятиме нелінійну залежність із точкою максимального вмісту кверцетину – межею розчинності – як максимумом на кривій (рис. 3.2).

Для більш точного визначення положення максимуму на кривій отриману залежність апроксимують поліноміальною функцією 2-го або 3-го порядку з наступним взяттям першої похідної (рис.3.2). Для цього використовували пакет для математичної обробки даних, - MicroCal Origin version 3.01 (USA).

### 3.3.3 Умови проведення тесту «Розчинення» відповідно до вимог БСК

Інші умови розчинення відповідали вимогам БСК до умов тесту розчинення під час проведення біовейвера. Середовище розчинення – вода очищена з рН 7,0. Об'єм середовища розчинення – 1000 мл. Тестер розчинності за методом USP 2 (лопоть). Швидкість обертання 100 об/хв. Температура нагрівання: 37°C ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Відбір проб проводився із центру резервуару через 5, 10, 20 та 30 хв.

Об'єм відібраних проб становив 1,0 мл. Сумарний об'єм що відібрали під час аналізу склав 4,0 мл, що незначно впливає на концентрацію кверцетина у розчинах, для яких проводили вимірювання.

Аліквоту центрифугували протягом 10 хв. при 10000 об/хв. 0,5 мл верхнього шару обережно відбирали після центрифугування, уникаючи попадання на агломерати нижнього шару, та переносили у віали для хроматографії.

Застосування МС-детектора дозволило ідентифікувати досліджувану речовину за масою молекулярного іона, а також різко підвищило селективність і чутливість розробленої аналітичної методики щодо спектрофотометричного детектування зазначеної речовини.

### 3.3.4 Результати експериментальних досліджень першого етапу

Результати першої частини експерименту наведені в таблиці 3.3:

*Таблиця 3.3*

#### **Результати визначення кількісного вмісту кверцетину, переведеного в розчин, в залежності від часу аналізу**

Час відбору проб, хв	Площа піку кверцетину, S	Вміст кверцетину, мг/мл	Вміст кверцетину від номінального, %
5	120,157	0,00069	11,44
10	547,437	0,00313	52,14
20	745,922	0,00470	78,33
30	818,272	0,00496	82,71

На підставі отриманих результатів була побудована залежність, що характеризує ступінь переходу кверцетину в розчин залежно від часу вимірювання. Графік залежності концентрації кверцетину в розчині від часу представляє собою типову ізотерму Ленгмюра (рис.3.2).

Ступінь вивільнення кверцетину в розчин розраховували як частку кверцетину, що перейшов у розчин, до початкової наважки, взятої для проведення дослідження та вимірювали у відносних одиницях.

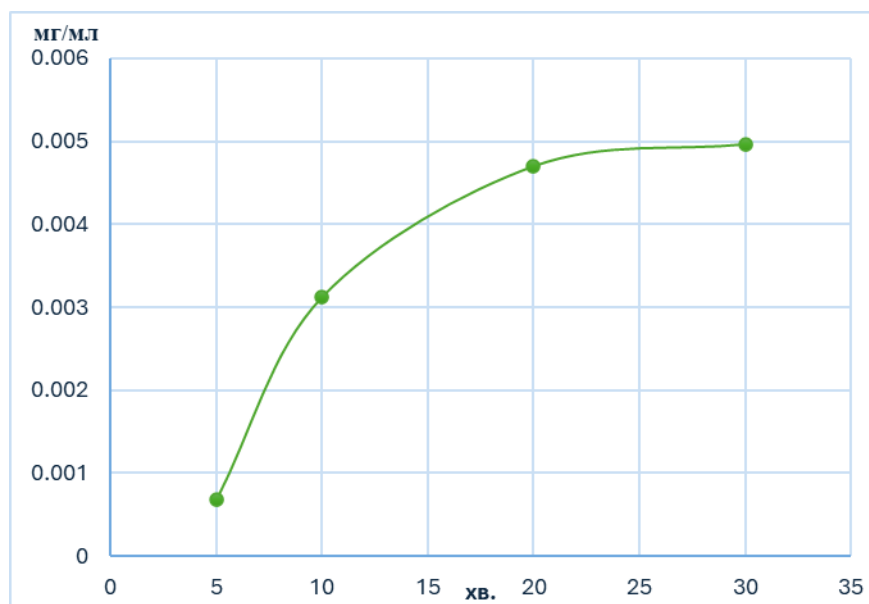


Рис.3.2 Графік залежності концентрації кверцетину в розчині від часу

Аналіз отриманої залежності дозволяє стверджувати, що досягнення концентрації кверцетину близької до рівноважної (псевдорівноважної) відбувається протягом 30 хв. Відповідно до вимог БСК, вивільнення речовини в розчин є задовільним при розчиненні 80% вихідної наважки досліджуваної речовини. Слід зазначити, що концентрація кверцетину в розчині, що відповідає цим умовам, дорівнює 0,0047 мг/мл, що досягається через 20 хв. Це свідчить про те, що максимальна концентрація була досягнута і варіабельність усіх наступних вимірювань пов'язана лише з похибкою аналізу.

Отримане значення часу, необхідного для розчинення обраної кількості кверцетину в заданому об'ємі розчинника, дозволило перейти до встановлення фактичної межі розчинності кверцетину шляхом визначення його концентрації у водних розчинах.



### 3.3.5 Кількісне визначення концентрації межі розчинності кверцетину

Друга частина експерименту мала на меті кількісне визначення концентрації кверцетину в розчині, що відповідає межі його розчинності. Для цього готували п'ять випробовуваних розчинів різної концентрації та об'єму.

Досліджуваний розчин 1: 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого зразку кверцетину вміщували в колбу ємністю 100 мл, додавали 50 мл води Р і розчиняли в ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили до позначки тим же розчинником та перемішували.

Досліджуваний розчин 2: 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого зразку кверцетину вміщували в мірну колбу ємністю 200,0 мл, додавали 100 мл води Р і масу розчиняли в ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили до позначки тим же розчинником та перемішували.

Досліджуваний розчин 3: 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого зразку кверцетину вміщували в мірну колбу ємністю 250,0 мл, додавали 100 мл води Р і масу розчиняли в ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили до позначки тим же розчинником та перемішували.

Досліджуваний розчин 4: 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого зразку кверцетину вміщували в мірну колбу ємністю 500,0 мл, додавали 250 мл води Р і масу розчиняли в ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили до позначки тим же розчинником та перемішували.

Досліджуваний розчин 5: 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого зразку кверцетину вміщували в мірну колбу ємністю 1000,0 мл, додавали 500 мл води Р і масу розчиняли на ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили до позначки тим же розчинником та перемішували.

Далі обережно відібрали аліквоту отриманих розчинів досліджуваних зразків і розчинів порівняння з центру сосуду та переносили в пробірки на 2 мл

для центрифугування. Центрифугували протягом 10 хв. при 10000 об/хв. Аліквоту 1 мл верхнього шару обережно відбирали після центрифугування, уникаючи попадання на агломерати нижнього шару, та переносили у віали для хроматографії.

Концентрацію кверцетину в отриманих зразках визначали хроматографічним методом з використанням зовнішнього стандарту. В якості стандарту використовували фармакопейний стандарт кверцетину – стандартний зразок кверцетину (USP).

Розчин порівняння: у мірну колбу ємністю 1000,0 мл вміщували 6,0 мг (точна наважка) ретельно подрібненого стандартного зразку кверцетину, додавали 500 мл ацетонітрилу Р і розчиняли масу на ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили водою Р до позначки і перемішували.

Розчин порівняння готували одночасно з приготуванням п'яти досліджуваних розчинів. Всі розчини використовували негайно після приготування.

Одержані експериментальні дані наведено в таблиці 3.4

*Таблиця 3.4*

**Кількісний вміст кверцетину, що перейшов у розчин, у залежності від об'єму**

Об'єм розчину, мл	Теоретична концентрація кверцетину, мг/мл	Виміряна площа піку кверцетину, С	Вміст кверцетину, мг/мл	Вміст кверцетину, мкг/мл
0,20	0,0050	170,78	0,0010	1,00
0,30	0,0033	354,58	0,0030	3,00
0,350	0,0028	348,03	0,0029	2,90
0,40	0,0025	289,18	0,0026	2,60
0,50	0,0020	194,58	0,0018	1,80
Вихідне стандартне відхилення (SD)			0.0084	0,84

За даними вимірювань в координатах «концентрація – ступінь розведення» побудовано нелінійну залежність (рис. 3.3). Початкова ділянка кривої демонструє зростання концентрації кверцетину в розчині зі збільшенням об'єму розчину. Ймовірно, це пояснюється зниженням термодинамічного обмежування розчинності кверцетину, що призводить до зростання його концентрації у розчині при постійно зростаючій швидкості розчинення кверцетину. Цей процес триває до досягнення якогось значення рівноважної (псевдорівноважної) концентрації та супроводжується зниженням швидкості розчинення кверцетину. Подальше збільшення об'єму розчину, навпаки, призводить до зниження концентрації, оскільки досягнута рівноважна (псевдорівноважна) концентрація кверцетину піддається все більшому розведенню. Це виражається на графіку спадаючою гілкою кривої. Точка перегину цієї залежності відповідатиме найбільш повному розчиненню кількості кверцетину, яка була взята для приготування досліджуваного розчину.

У даному випадку, точність встановлення значення, що відповідає межі розчинності кверцетину, прямо пропорційна кількості вимірюваних значень концентрації кверцетину в розчині і отже точок на графіку кривої. Проведення великої кількості визначень (не менше 20), необхідної для досягнення заданої точності 5% при визначенні межі розчинності, робить запропонований метод надзвичайно тривалим у часі та затратним. Це унеможлиблює його широке застосування.

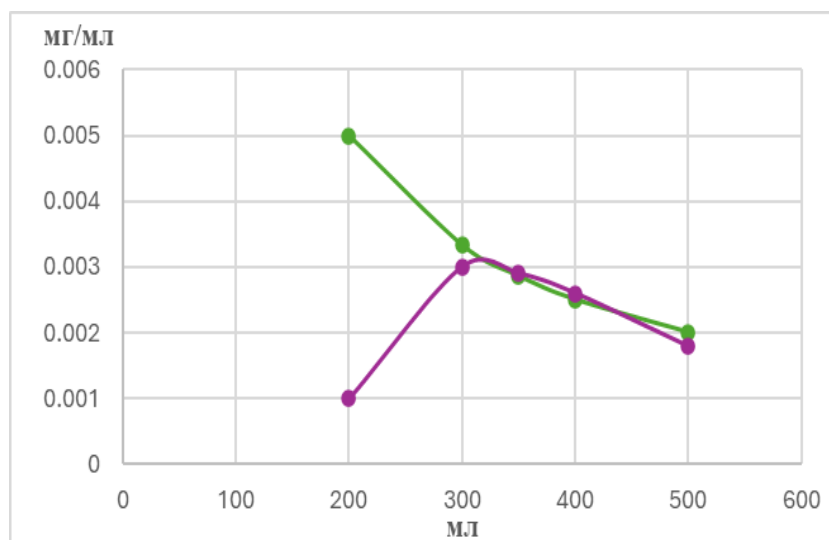


Рис. 3.3 Графік залежності концентрації кверцетину від об'єму розчинника

Тому був запропонований інший підхід, що дозволяє при відносно невеликій кількості вимірювань (до 10), набувати більш точного значення цієї точки, яка буде відповідати межі розчинності кверцетину у воді.

Розв'язання цього завдання полягає в спробі апроксимувати отримані експериментальні дані певної математичної функції. Для цього були розглянуті два варіанти: полінома 2-го ступеня і полінома 3-го ступеня. Отримані результати подано на рисунках 3.4-3.5:

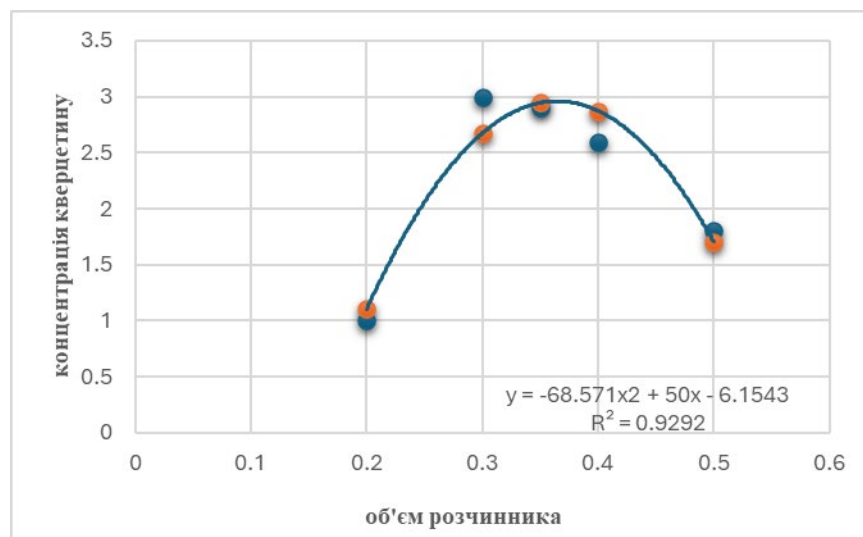


Рис. 3.4 Графік поліному 2-го ступеня

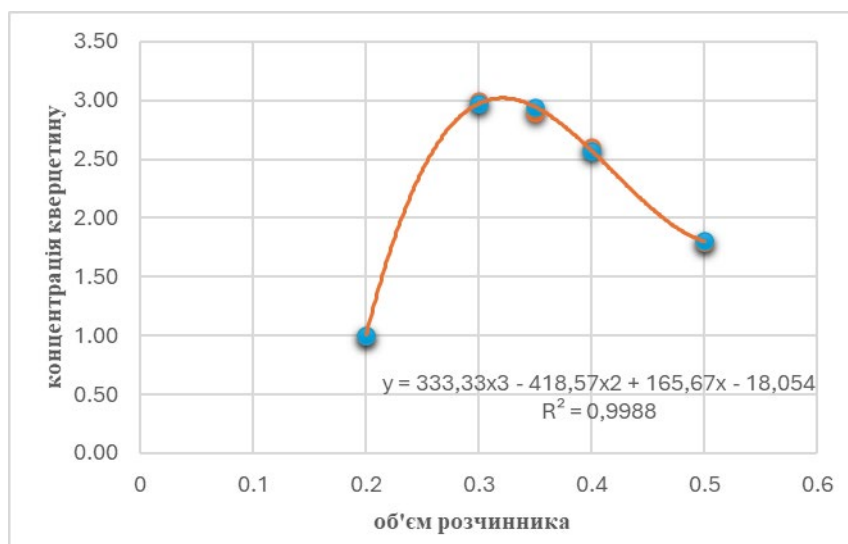


Рис. 3.5 Графік поліному 3-го ступеня

### 3.3.6 Статистичний аналіз одержаних даних

Проведений регресійний аналіз отриманих залежностей дозволив розрахувати низку статистичних параметрів: стандартного відхилення (SD), критерію Фішера (F), критерій детермінації ( $R^2$ ) та ймовірність (%) [90]. Значення наведені у таблицях 3.5-3.6.

Порівнюючи значення отриманих величин зазначених статистичних параметрів, було знайдено той варіант, модель якого найбільш точно описує представлений графік - поліном третього ступеня.

Для того, щоб оцінити наскільки адекватним є встановлений нами кореляційний зв'язок виміряних параметрів, ми використали значення коефіцієнта детермінації та критерію Фішера, що допомагає уникнути упередженої оцінки при виборі. Відомо, що з ймовірності 0,05 придатними значеннями коефіцієнта кореляції вважатимуться значення що мають значення більше 0,99, якщо йдеться про методики кількісного визначення [102]. Поліноміальна функція 3-го порядку відповідає цій вимозі.

Цей варіант із найвищим показником коефіцієнта детермінації є найбільш достовірним, незважаючи на те, що він має найменше значення ступеня свободи – 1.

Таблиця 3.5

### Статистичний аналіз поліному 3-го ступеня

Рівняння поліному $y = A \cdot x^3 + B \cdot x^2 + C \cdot x + D$ $y = 333,33 \cdot x^3 - 418,57 \cdot x^2 + 165,67 \cdot x - 18,054$ ( $R^2 = 0,9988$ )			
Кількість вимірювань (n)	Вихідні дані	Розрахункові дані (Ycalc)	Квадрат різниці ((Y - Ycalc) <sup>2</sup> )
1	1,00	1,00384	0,0000147
2	3,00	2,97561	0,0005949
3	2,90	2,94720	0,0022277
4	2,60	2,57592	0,0005798
5	1,80	1,80475	0,0000226
Вихідне стандартне відхилення (SD)	0,84		
Ступінь свободи (k)	4		
Ступінь свободи (n-k)	1		
Сума (Sum)			0,00344
Залишкове стандартне відхилення (SD <sub>rest</sub> )			0,05864
Критерій Фішера F			208,736
Перевірочне значення $R^2 = 1 - 1/F =$			0,99521
Ймовірність, %			0,477
Критерій, %			< 5

Таблиця 3.6.

### Статистичний аналіз поліному 2-го ступеня

Рівняння поліному $y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$ $y = -68,571x^2 + 50 \cdot x - 6,1543$ ( $R^2 = 0,9292$ )			
Кількість вимірювань (n)	Вихідні дані	Розрахункові дані (Ycalc)	Квадрат різниці ((Y - Ycalc) <sup>2</sup> )
1	1,00	1,10286	0,01058

Продовження Таб. 3.6.

2	3,00	2,67431	0,10607
3	2,90	2,94575	0,00209
4	2,60	2,87434	0,07526
5	1,80	1,70295	0,00942
Вихідне стандартне відхилення (SD)	0,84		
Ступінь свободи (k)	3		
Ступінь свободи (n-k)	2		
Сума (Sum)			0,203428
Залишкове стандартне відхилення ( $SD_{rest}$ )			0,318927
Критерій Фішера F			7,059
Перевірочне значення $R^2 = 1 - 1/F =$			0,8583
Ймовірність, %			12,8
Критерій, %			< 5

Розрахункові значення критерію Фішера були обчислені як відношення квадратів залишкових стандартних відхилень отриманих для вибірки вимірних концентрацій кверцетину та значень розрахованих для вибраних кореляційних залежностей заданої ймовірності 0,05.

Для поліному 3-ого ступеню виконуються вимоги критерію Фішера. Враховуючи це та значення коефіцієнта детермінації, залишкового стандартного відхилення і ймовірності, його можна використовувати для прогнозування необхідної величини – межі розчинення. Для цього отриману експериментальну залежність апроксимували поліноміальною залежністю третього ступеня (рис 3.5.). Для поліному 2-го ступеня (рис. 3.4.) вимоги критерію Фішера так само виконуються, проте розраховане значення критерію детермінації для нього має менше значення, ніж для поліному третього ступеня. Також для поліному 2-го ступеня маємо більш високе значення ймовірності 12,8 % порівняно з поліноміальною залежністю третього ступеня, якої відповідає значення 0.477%.

Все це робить поліноміальну залежність другого ступеня менш придатною до апроксимації експериментальних результатів.

На графіках (рис. 3.4-3.5) поліному 2-го ступеня та поліному 3-го ступеня, відповідно, ми можемо спостерігати розташування точок концентрації, отриманих шляхом теоретичного розрахунку та експериментально. Добре видно, що розташування точок, як теоретичних, і практичних найкраще визначає поліноміальна функція саме 3-го порядку.

Знаючи тип кореляційної залежності легко розрахувати значення межі розчинності взявши першу похідну, значення якої буде відповідати значенню точки перегину аналізованої кривою. Таким чином, використовуючи поліноміальну залежність третього ступеня та розв'язуючи систему рівнянь за допомогою математичного пакета *MicroCal Origin*, отримали значення концентрації, що відповідає точці перегину досліджуваної залежності. Отримане значення відповідає межі розчинності кверцетину.

Відповідно до проведених вище розрахунків значення становило 3,1 мкг/мл. Це значення узгоджується з даними, що підтверджують обмежену розчинність кверцетину у водних середовищах з нейтральним значенням рН. Так, у роботі Ковалевської І. кверцетин належить до практично нерозчинних речовин (0,435 г/100 мл води очищеної при рН 7,0) [103].

Головною перевагою запропонованого методу кількісного визначення межі розчинності, що ми змогли кількісно визначити, з точністю, що не перевищує похибки хроматографічного методу визначення, яка становила 1,6%, межу розчинності важко розчинних у воді речовин. До цього методик, що дозволяють стандартизувати умови кількісного визначення межі розчинності для заданої похибки вимірювань, не було. Фармакопеї провідних країн таких даних не містять. Відсутність таких даних унеможливорює вивчення біодоступності важко розчинних у воді речовин методами *in vitro*.



Основним прикладом для порівняння отриманих результатів стала методика, описана в роботі, присвяченій вивченню межі розчинності кверцетину в умовах варіабельності рН [104-105].

Однак, порівняльний аналіз виявляє істотні відмінності. По-перше, у наведеній вище роботі дослідження межі розчинності кверцетину проведено при значеннях рН, що відповідають кислим і лужним середовищам, що потребує подальшої екстраполяції даних для рН 7,0 [105]. Ми можемо проводити всі дослідження при значеннях рН, що відповідають як кислим, слабо кислим так і нейтральним значенням середовища розчинення.

Це є перевагою та відмінністю, оскільки підхід, запропонований авторами, дозволяє безпосередньо вимірювати концентрацію речовини для всього діапазону рН як цього потребує проведення досліджень біодоступності ліків [106].

Друга суттєва відмінність полягає в тому, що в роботі визначене значення межі розчинності кверцетину виходить за межі вимірюваних значень [104]. Це значно знижує точність отриманого значення, оскільки воно було отримано шляхом екстраполяції. У нашому дослідженні значення межі розчинності знаходиться в експериментально досліджуваному інтервалі, що значно підвищує точність наших вимірювань.

### 3.4 Визначення межі розчинності кверцетину методом визначення загального органічного карбону (ТОС)

Оскільки з літературних даних неможливо сформулювати точне значення межі розчинності, рівно як і перерахувати дієві методи для встановлення цієї характеристики, поставлена задача була виконана у повному обсязі за допомогою розробленого методу із використанням ВЕРХ-МС. Метод визначення межі розчинності кверцетину у водних розчинах методом ВЕРХ-МС, описаний вище, успішно дозволив встановити значення цієї характеристики, однак стверджувати

правдивість отриманих результатів важко в рамках лише одного аналітичного методу.

Тому був розроблений альтернативний метод визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі за допомогою методу визначення загального органічного карбону.

Зі свого боку, цей альтернативний метод має свої власні переваги:

- так, робота з дуже низькими концентраціями кверцетину, у методі із використанням ВЕРХ-МС, створює проблему точності отриманих вимірів, і вимоги до похибки вимірів дуже жорсткі (5%);
- другим аргументом на користь використання аналізатора загального органічного вуглецю є той факт, що цей метод не вимагає використання стандартів для аналізу. Що значно спрощує та здешевлює процес досліджень.

З літературних даних відомо, що кверцетин має хорошу розчинність у розчинах кислот, не менше 0,06 мг/мл [3]. Таким чином, для розчинів кверцетину в кислих та слабокислих середовищах можна отримати досить точні значення межі розчинності.

Використовуючи зазначені вище міркування, виникла потреба у розробці методики кількісного визначення межі розчинності кверцетину методом ТОС в кислих та слабокислих водних середовищах. Необхідно також було розробити метод кількісного визначення межі розчинності речовини з похибкою визначення не більше 5,0 %, що дозволило б порівнювати результати визначення з даними інших методів, зокрема хроматографічними.

Точне встановлення межі розчинності кверцетину методом ТОС вимагає проведення наступних стадій:

а) Розробка методу кількісного визначення кверцетину у розчинах в діапазоні різних значень рН (кислих та слабокислих) методом ТОС.

б) Встановивши значення загального органічного вуглецю у приготованих розчинах, ми отримуємо дані про концентрацію кверцетину в розчинах залежно від рН розчинника.

в) Вимір кількісного значення межі розчинності кверцетину в розчинах з різним значенням рН.

г) Останній етап складається з аналізу отриманих даних вимірювань та розрахунку кількісного значення межі розчинності кверцетину з використанням моделей математичної екстраполяції.

#### 3.4.1 Приготування досліджуваних розчинів

Досліджуваний розчин 1: 6,0 мг (точна маса) ретельно перетертого і висушеного до постійної маси зразка кверцетину вміщували в мірну колбу на 1000,0 мл, додавали 900 мл води і потенціометрично титрували 1М хлористоводневою кислотою до встановлення значення рН рівного 3,0. Після цього розчиняли наважку на ультразвуковій бані протягом 10 хв. і доводили до позначки тим же розчинником з наступним перемішуванням.

Досліджуваний розчин 2: 6,0 мг (точна маса) ретельно перетертого і висушеного до постійної маси зразка кверцетину вміщували в мірну колбу на 1000,0 мл, додавали 900 мл води і потенціометрично титрували 1М хлористоводневою кислотою до встановлення значення рН рівного 4,0. Після цього розчиняли наважку на ультразвуковій бані протягом 10 хв. і доводили до позначки тим же розчинником з наступним перемішуванням.

Досліджуваний розчин 3: 6,0 мг (точна маса) ретельно перетертого і висушеного до постійної маси зразка кверцетину вміщували в мірну колбу на 1000,0 мл, додавали 900 мл води і потенціометрично титрували 1М хлористоводневою кислотою до встановлення значення рН рівного 4,5. Після цього розчиняли наважку на ультразвуковій бані протягом 10 хвилин і доводили до позначки тим же розчинником з наступним перемішуванням.

Досліджуваний розчин 4: 6,0 мг (точна маса) ретельно перетертого і висушеного до постійної маси зразка кверцетину вміщували в мірну колбу на 1000,0 мл, додавали 900 мл води і потенціометрично титрували 1М хлористоводневою кислотою до встановлення значення рН рівного 5,0. Після

цього розчиняли наважка на ультразвуковій бані протягом 10 хв. і доводили до позначки тим же розчинником з наступним перемішуванням.

Вміст загального вуглецю визначають кондуктометрично. На приладі для визначення загального органічного вуглецю 450 TOC (METTLER TOLEDO), із діапазоном вимірюваних значень, що склав 0.05–1000 ppbC.

Валідація методики визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі методом визначення TOC наведена у Додатку В.

Всі ліпофільні речовини, як правило, добре розчиняються у водних середовищах, що мають кисле, слабкокисле, слабколужне та лужне значення рН. Зокрема, кверцетин добре розчинний у кислих середовищах. Таким чином, з'являється можливість досить точно визначити межу розчинності для розчинів досліджуваної речовини в кислих або лужних середовищах, оскільки через високу розчинність речовини різко підвищується межа кількісного виявлення методики.

Таким чином, отримуємо ряд розчинів, де єдиним джерелом вуглецю є внесена нами наважка кверцетину.

### 3.4.2 Результати визначення межі розчинності кверцетину методом TOC

Метод TOC заснований на технології безперервного вимірювання, в потоці аналізованої рідини, що проходить по кварцовій трубці спіральної форми, при постійному УФ-випромінюванні. Це призводить до повного окиснення кверцетину з утворенням карбонової кислоти та появи іонної провідності. Загальний вміст органічного карбону прилад розраховує за диференційною електропровідністю, яка вимірюється високоточними кондуктометричними датчиками.

Попередньо вимірявши значення TOC в приготовлених розчинах, ми отримуємо дані про концентрацію кверцетину в розчинах залежно від рН розчину.

Побудувавши графічну залежність виміряних значень концентрації речовини від значень рН досліджуваних розчинів отримуємо математичне рівняння залежності. Використовуючи отримане рівняння функції, можна

апроксимувати значення концентрації речовини значення рН рівного 7,0. Ця величина і буде межею розчинності досліджуваної речовини для нейтральних середовищ.

Нижче наведено результати вимірювання розчинів кверцетину в кислих середовищах, що мають значення рН: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 (табл. 3.7-3.10).

Таблиця 3.7

### Виміряні значення загального карбону при рН 3,0

№	ТОС розчинника, ppbC	Виміряне значення ТОС, ppbC	Виправлене значення ТОС, ppbC	Концентрація кверцетину в пробі, мг/мл
1	0,009	0,150	0,141	0,0023
2	0,009	0,155	0,146	0,0024
3	0,009	0,153	0,144	0,0024
Відносне стандартне відхилення, %				1,75

Таблиця 3.8

### Виміряні значення загального карбону при рН 4,0

№	ТОС розчинника, ppbC	Виміряне значення ТОС, ppbC	Виправлене значення ТОС, ppbC	Концентрація кверцетину в пробі, мг/мл
1	0,009	0,092	0,083	0,0013
2	0,009	0,090	0,081	0,0013
3	0,009	0,093	0,084	0,0014
Відносне стандартне відхилення, %				1,84

Таблиця 3.9

### Виміряні значення загального карбону при рН 4,5

№	ТОС розчинника, ppbC	Виміряне значення ТОС, ppbC	Виправлене значення ТОС, ppbC	Концентрація кверцетину в пробі, мг/мл
1	0,009	0,086	0,077	0,0012
2	0,009	0,085	0,076	0,0012
3	0,009	0,087	0,078	0,0013
Відносне стандартне відхилення, %				1,29

Таблиця 3.10

**Виміряні значення загального карбону при рН 5,0**

№	ТОС розчинника, ppbC	Виміряне значення ТОС, ppbC	Виправлене значення ТОС, ppbC	Концентрація кверцетину в пробі, мг/мл
1	0,009	0,075	0,066	0,0011
2	0,009	0,076	0,067	0,0011
3	0,009	0,075	0,066	0,0011
Відносне стандартне відхилення, %				1,12

## 3.4.3 Статистичний аналіз одержаних даних

Для виміряних значень був проведений статистичний аналіз отриманих значень, що включає, розрахунок середніх значень, стандартного відхилення та відносного стандартного відхилення. Отримані значення наведено нижче у таблиці 3.11:

Таблиця 3.11

**Середні значення загального карбону при рН: 3.0; 4.0; 4.5; 5.0**

№	Значення рН	Середні значення концентрації кверцетину в пробі, мг/мл	Середні значення концентрації кверцетину в пробі, мг/л
1	3,0	0,00241	2,3673
2	4,0	0,00139	1,3935
3	4,5	0,00129	1,2928
4	5,0	0,00111	1,1005
Відносне стандартне відхилення, %			0,56

Для використаного для проведення вимірювань аналізатора загального карбону, згідно з даними виробника, похибка вимірювань не повинна перевищувати  $\pm 0,1$  ppbC при концентрації ТОС  $< 2,0$  ppbC (якість води  $> 15$  мОм·см [0,067 мкСм/см]). Відтворюваність вимірювань повинна мати похибку не

більше  $\pm 0,05$  ppbC < 5 ppbC,  $\pm 1,0\%$  > 5 ppbC. Похибка приготування проб для методики, що використовується при проведенні вимірювань, склала 0,2%.

Таким чином, враховуючи наведені вище дані можна стверджувати, що отримані результати є статистично придатними, оскільки не обтяжені значимою похибкою вимірювань, не більше 2%, що дозволяє їх використовувати для прогнозування значення межі розчинності для середовищ з рН 7,0 методом екстраполяції отриманої залежності виміряних значень значення рН досліджуваних розчинів.

Використовуючи середні значення концентрації кверцетину, була побудована графічна залежність виміряних значень від величини рН досліджуваних розчинів (рис.3.6).



Рис. 3.6 Графік залежності виміряних значень від значення рН досліджуваних розчинів

Основним завданням дослідження було знайти значення концентрації кверцетину при нейтральному рН, що задовольняє вимогам БСК [1].

Розв'язання цього завдання полягає в спробі апроксимувати отримані експериментальні дані певною математичною функцією і методом екстраполяції знайти точку концентрації при рН=7. Для цього були розглянуті два варіанти: функція полінома 2-го ступеня та степеневій функції. Отримані результати подано на рисунках 3.7 та 3.8.

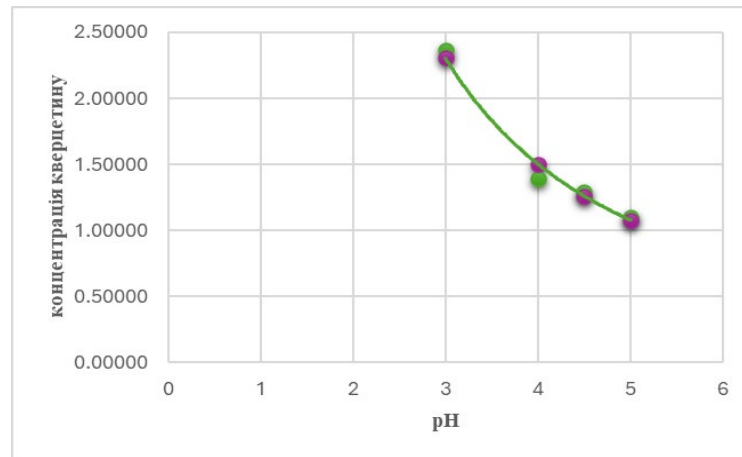


Рис. 3.7 Графік ступеневої функції

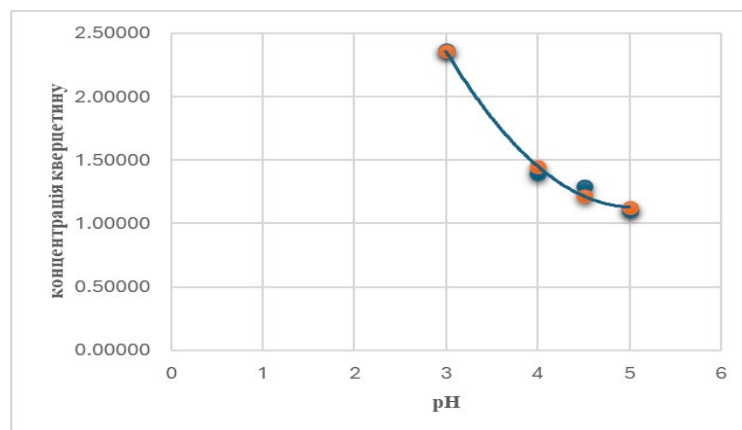


Рис. 3.8 Графік поліному 2-го ступеня

Проведений регресійний аналіз отриманих залежностей дозволив розрахувати низку статистичних параметрів: стандартного відхилення (RSD), критерію Фішера (F), критерій детермінації ( $R_2$ ) та ймовірність (%). Значення наведені у таблицях 3.12 та 3.13.

Після проведення порівняльного аналізу значень, отриманих величин зазначених статистичних параметрів, ступенева функція була визначена як модель, яка найбільш точно описує представлений графік.



Таблиця 3.12

## Розраховані критерії для ступеневої функції

Рівняння: $y = A \cdot x^{(-B)}$ $y = 11,818x^{(-1,488)}$				
Кількість вимірювань (n)	pH	Вихідні дані	Розраховані дані ( $Y_{calc}$ )	Різниця в квадраті ( $(Y - Y_{calc})^2$ )
1	3	2.3673	2.3045	0.00395
2	4	1.3935	1.5020	0.01176
3	4.5	1.2928	1.2605	0.00104
4	5	1.10057	1.0776	0.00053
Ступінь свободи (k)		2		
Ступінь свободи (n-k)		2		
Сума (Sum)				0.01728
Залишкове стандартне відхилення (RSD)				0.09205
Тест Фішера (F)				37.048
Перевірочні значення $R^2=1 - 1/F =$				0.9730
Ймовірність, % (< 5)				2.6

Таблиця 3.13

## Розраховані критерії для поліному 2-го ступеню

Рівняння: $y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$ $y = 0,2928x^2 - 2,957 \cdot x + 8,5934$				
Кількість вимірювань (n)	pH	Вихідні дані	Розраховані дані ( $Y_{calc}$ )	Різниця в квадраті ( $(Y - Y_{calc})^2$ )
1	3	2.3674	2.35760	0.00010
2	4	1.3935	1.45020	0.00321
3	4.5	1.2928	1.21610	0.00589
4	5	1.10057	1.12840	0.00077
Ступінь свободи (k)		3		
Ступінь свободи (n-k)		1		
Сума (Sum)				0.00996
Залишкове стандартне відхилення (RSD)				0.09982
Тест Фішера (F)				32.120
Перевірочні значення $R^2=1 - 1/F =$				0.9689
Ймовірність, % (< 5)				12.9

Для того, щоб оцінити наскільки нами адекватно встановлений кореляційний зв'язок виміряних параметрів ми використали значення коефіцієнта детермінації ( $R^2$ ) та критерію Фішера, що допомагає уникнути упередженої оцінки при виборі.

Для рівняння ступеневої функції виконуються вимоги критерію Фішера. Враховуючи це значення, а також коефіцієнт детермінації, залишкового стандартного відхилення і ймовірності, його можна використовувати для прогнозування необхідної величини - межі розчинення. Для цього отриману експериментальну залежність апроксимували ступеневою функцією (рис. 3.7).

Відповідно до наведених вище таблиць, величина  $R^2$  для ступеневої функції і для поліному 2-го порядку склали майже однакове значення (0.97). Однак значення ймовірності (%) для поліному 2-го порядку становить 12,9% порівняно зі ступеневою функцією, для якої це значення становить 2,6%. Критерій Фішера (F) для ступеневої функції склав 37.048, для поліноміальної функції - 32.120. Залишкове стандартне відхилення (RSD) для ступеневої функції склали 0.092, для полінома 2-го порядку 0,099. Результати оцінюють поліноміальну залежність 2-го ступеня як менш підходящу інтерпретації результатів дослідження [102]. На графіках 3.7 і 3.8, ступеневої функції та поліному 2-го ступеня, відповідно, ми можемо спостерігати розташування точок концентрації, отриманих шляхом теоретичного розрахунку та експериментально. Добре видно, що розташування точок, як теоретичних, і практичних найкраще визначає ступенева функція.

Знаючи значення рН, при якому ми повинні отримати значення, що нас цікавить, ми можемо розрахувати за рівняннями запропонованих функцій значення концентрації межі розчинності. Таким чином, використовуючи ступеневу функцію і вирішуючи систему рівнянь за допомогою пакета Excel, ми отримали значення концентрації, відповідної точки рН 7. Отримане значення відповідає межі розчинності кверцетину. Отримане значення становило 0,7 мкг/мл в результаті вирішення рівняння ступеневої функції. Необхідно відзначити, що

отримані дані корелюються з даними, отриманими нами в першому експерименті, в ході якого було використано метод ВЕРХ-МС як метод аналітичного аналізу.

Зважаючи на викладені обмеження, завдяки розробленим методам визначення межі розчинності кверцетину ВЕРХ-МС та ТОС з'явилась можливість провести дослідження *in vitro* для кверцетину з метою вирішення різних фармацевтичних завдань.

### Висновки до розділу 3

1. Визначено можливий вплив розміру часток на кінетику розчинення кверцетину. За результатами вимірювань встановлено, що розмір більшості часток знаходиться в межах 60-90 мкм. Базуючись на розмірі часток обґрунтовано вибор часу розчинення кверцетину для здійснення наступних експериментів.

2. Обґрунтовано послідовність етапів для визначення межі розчинності

3. Розроблена нова методика визначення точного значення межі розчинності кверцетину у водному середовищі із застосуванням методу ВЕРХ-МС. Визначення валідаційних характеристик підтвердило її коректність для поставлених завдань.

4. Визначено залежність концентрації кверцетину, що переходить у розчин, від часу аналізу. Встановлено, що концентрація, близька до рівноважної досягається близько до 30 хв., а перехід кількості, що відповідає вимогам БСК (80%) досягається вже через 20 хв.

5. Визначено залежність концентрації кверцетину від об'єму розчину. Для розрахунку межі розчинення кверцетину використано поліноміальний аналіз зі статистичною обробкою даних. Встановлено, що для апроксимації одержаних результатів більш придатною виявилась поліноміальна залежність третього ступеня. Значення концентрації, що відповідає точці перегику, обраховано за допомогою математичного пакета MicroCal Origin. За результатами розрахунків

встановлено межу розчинності кверцетину в водних середовищах (3,1 мкг/мл).

6. Розроблено оригінальну альтернативну методику визначення точного значення межі розчинності кверцетину у водному середовищі при кислих значеннях рН (від 3,0 до 5,0) із застосуванням методу ТОС. Коректність розробленої методики підтверджено валідаційними дослідженнями.

7. Методом екстраполяції даних на основі результатів вимірювань концентрації кверцетину в кислому середовищі знайдено значення концентрації кверцетину при рН 7. З використанням ступеневої функції та розв'язанням системи рівнянь за допомогою пакета Excel одержано значення межі розчинності кверцетину 0,7 мкг/мл

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 3 (43). P. 58–66.

2. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. Development of a new solution for determining the solubility limit of quercetin and other poorly soluble substances in aqueous solutions using the method for determining total organic carbon. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 4(44). P. 54–62.

3. Ханіна Н.В., Георгіянец В. А., Ханін В.А. Розробка методики вибору речовини маркеру при аналізі комбінованих рослинних препаратів, що містять кверцетин. International scientific and practical conference 'X Innovate scientific research: theory and practice'; матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, 21-24 листопада 2023 р., м. Стокгольм, Швеція, 2023.

## РОЗДІЛ ІV

### ДОСЛІДЖЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ В ПРОЦЕСІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ

Першим етапом спроби застосування запропонованого підходу для аналізу лікарських засобів було визначення біодоступності кверцетину в процесі фармацевтичної розробки. Для апробації прийнятності запропонованого нами підходу ми обрали як моно- так і полікомпонентні лікарські засоби. Першим - найбільш простим - є препарат, що містить кверцетин як єдиний АФІ. В цьому випадку він виконує роль як активного, так і аналітичного маркера. Звичайно до складу будь-якого лікарського засобу входять допоміжні речовини, що можуть впливати на процес та кінетику вивільнення кверцетину і таким чином впливати на дослідження біодоступності. Тому в цьому випадку цей вплив можуть чинити тільки допоміжні речовини. Таким препаратом став генеричний лікарський засіб «Квертин» таблетки жувальні, по 40 мг 3 блістера по 10 шт. виробництва «ПАТ НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ», Україна. За процедурою він був обраний як об'єкт дослідження та як приклад розробки оригінального препарату згідно з вимогами Настанови (для отримання інформації про серії досліджуваного лікарського засобу, що використовуються в дослідженнях біодоступності/біоеквівалентності та основних клінічних дослідженнях, для обґрунтування специфікацій контролю якості). Склад препарату наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

## Склад препарату «Квертин», таблетки жувальні

Назва компоненту	Вміст компоненту
«Квертин», таблетки жувальні	
<i>Діючі речовини:</i> 1 таблетка містить <i>кверцетину</i> (у перерахуванні на 100 % сухої речовини): <i>Допоміжні речовини:</i> пектин, глюкози моногідрат, сахароза, ароматизатор апельсин, магнію стеарат, тальк.	40,0 мг

## 4.1 Розробка методики визначення кверцетину

Субстанція кверцетину описана в монографії USP. У даній монографії не наведена хроматографічна методика кількісного визначення, а також методика визначення вмісту домішок в субстанції. У зв'язку з вищезазначеним, було розроблено методику хроматографічного кількісного визначення кверцетину в препараті «Квертин» для проведення тесту «Розчинення», оскільки наявність складної матриці допоміжних речовин може впливати на результат кількісного визначення.

## 4.1.1 Умови хроматографування

Ця методика використовує градієнтний режим елюювання для збільшення ступеня поділу компонентів субстанції з допоміжними речовинами, що містяться в препараті. Крім цього, в методиці ми використали МС-детектування, що значно збільшило чутливість і селективність методики. Ще однією перевагою нової методики стало використання хроматографічної колонки з розміром частинок 1,7 мкм, що дозволило поряд з чутливістю збільшити ефективність поділюваних піків.

Все це дозволило визначати досить низькі концентрації кверцетину (приблизно 0.1 ppm–1 ppm) без втрати точності, правильності та відтворюваності.

Для вимірювань використовували рідинний хроматограф Agilent 1290 з мас-спектрометричним детектором Agilent 6530 TOF, колонку 50 x 4,6 мм (Poroshell 120), заповнену сорбентом з прищепленою фазою октилсилікагелю (L1), розмір частинок – 1,7 мкм; з термостатичним регулюванням (30°C). *Рухома фаза А*: 0,1 М розчин трифтороцтової кислоти, дегазований в ультразвуковій бані; *рухома фаза В*: ацетонітрил Р; об'єм введення – 10,0 мкл. Високоселективний часопролітний мас-спектрометр мав наступні налаштування: тип іонізації: позитивна, електророзпилювальна (+ESI); режим вимірювання: сканування в діапазоні мас 50-1500; напруга на фрагментаторі 10 В; температура азоту - 350°C; витрата азоту - 10 мл/хв; тиск на небулайзері 35 PSI; напруга на капілярі 4 кВ. Режим елюції: градієнтний (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

#### Програма градієнту

t, мін	РФ А, %	РФ В, %
0	100	0
5	100	0
10	50	50
15	50	50
16	100	0
20	100	0

*Приготування розчину порівняння*: у колбу ємністю 100,0 мл вміщували 0,6 мг (точна наважка) ретельно подрібненого кверцетину, додавали 50 мл ацетонітрилу Р і розчиняли масу в ультразвуковій бані протягом 10 хв., після чого доводили водою Р до позначки і перемішували. Розчин порівняння готували одночасно з приготуванням досліджуваних розчинів. Всі розчини використовували відразу після приготування. За обраних нами умов були

одержані хроматограми повного іонного струму для зразків в трьох середовищах, із значеннями рН 1.2, 4.5 та 6.8 які планувалося використовуватися для проведення тесту «Розчинення» (рис.4.1-4.4). У якості стандартного зразку нами була використана субстанція кверцетину, оскільки невизначеність аналізу не перевищує 3%.

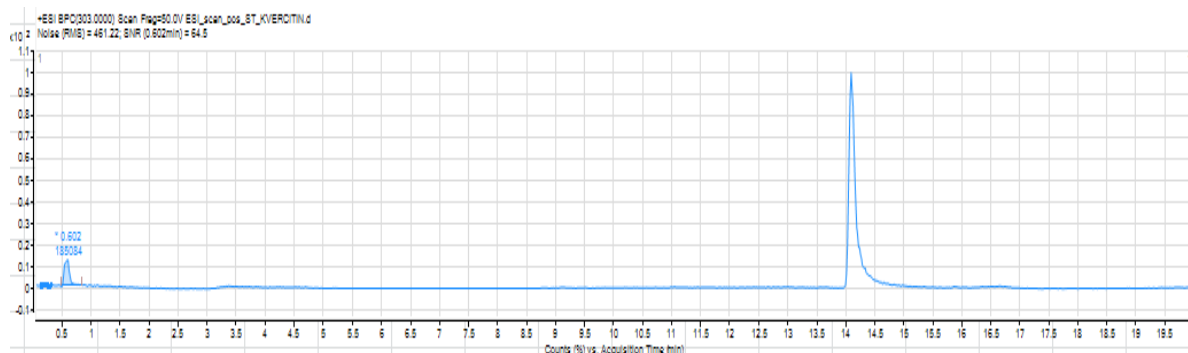


Рис. 4.1 Типова хроматограма розчину стандартного зразку кверцетину

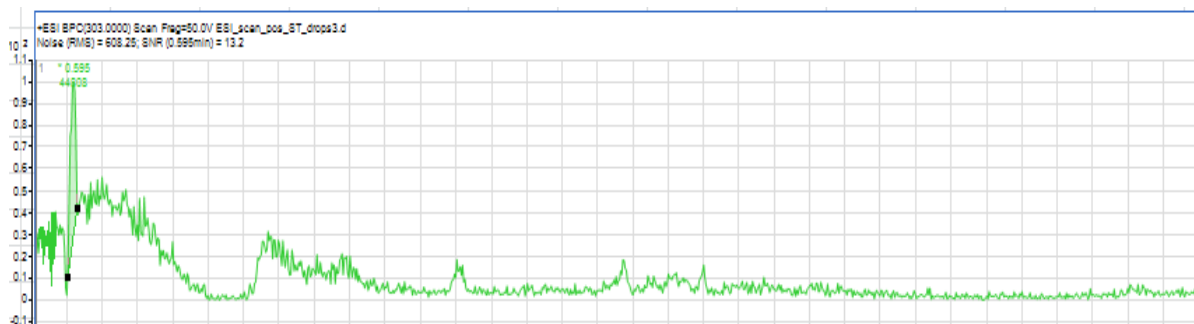


Рис. 4.2 Типова хроматограма досліджуваного розчину у препараті «Квертин»

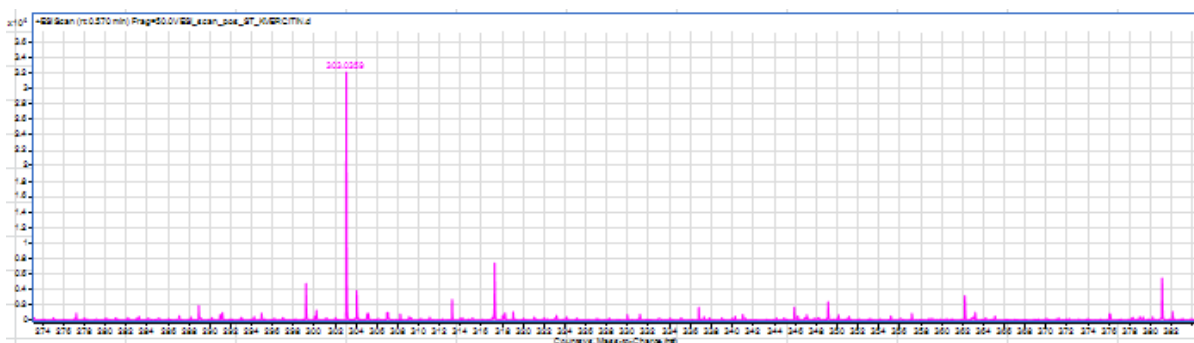


Рис. 4.3 Типовий мас-спектр розчину стандартного зразка кверцетину



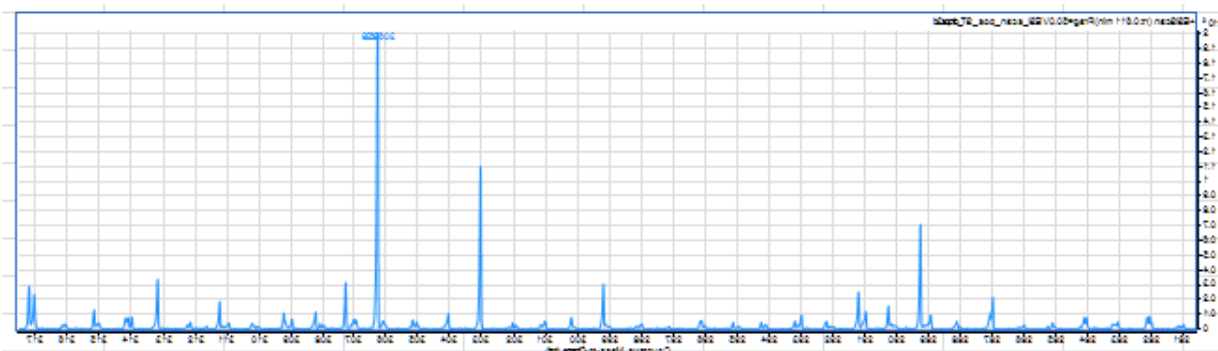


Рис. 4.4 Типовий мас-спектр кверцетину у препараті «Квертин»

#### 4.1.2 Валідація розробленої методики

Для того, щоб використовувати цю методику при проведенні випробувань по визначенню розчинності кверцетину, згідно зі схемою біовейвера для трьох середовищ розчинення з рН 1.2, 4.5 та 6.8, була проведена валідація методики як методу кількісного визначення зі значенням максимальної невизначеності 1,6%. Валідація методики проводилась за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, прецизійність правильність та внутрішньолaboratorна прецизійність [4].

Оскільки використовуваний в методиці метод ВЕРХ-МС є специфічним, для доказу того, що методика є специфічною достатньо, щоб виконувались усі вимоги до критеріїв лінійності, правильності, прецизійності та внутрішньолaboratorної прецизійності.

Модельні розчини для хроматографування готували за аналітичною методикою наведеною раніше. Методика приготування стандартного розчину. Холостий розчин готували аналогічно досліджуваному розчину препарату.

Оцінку лінійності проводили в діапазоні (80-120%) застосування методики за стандартною методикою. Дослідження характеру залежності сигналу від концентрації проводили з використанням 9 модельних розчинів для аналізу з точними концентраційними вагами: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120%. У той же час концентрація, прийнята за 100%, була концентрацією кверцетину, яка

знаходиться в середині діапазону, що охоплює мінімальну та максимальну концентрації кверцетину [4].

Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ [4]. Побудова калібрувального графіка здійснювалась у нормованих координатах. Для кожного з дев'яти зразків розчинів розраховували середні значення площі піку ( $S_i$ ). Отримані результати оброблено методом найменших квадратів для прямої  $Y = b \cdot x + a$  (Рис. 4.5) Розраховані статистичні значення  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (кінцеве стандартне відхилення) і  $r$  (коефіцієнт кореляції) наведені в таблиці 4.3.

У нашому випадку вимоги до параметрів лінійної регресії виконуються у всьому діапазоні застосування методики (80 - 120%).

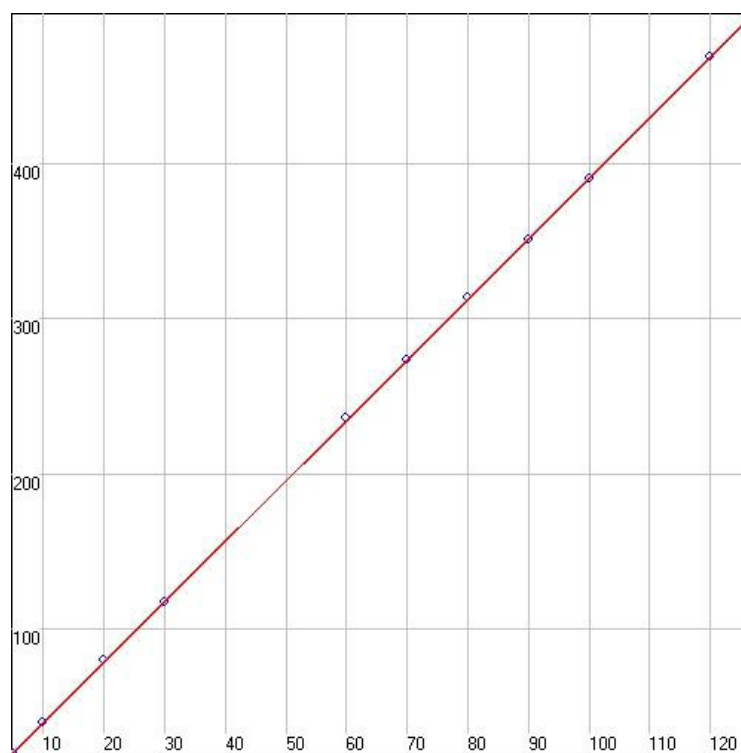


Рис. 4.5 Лінійна регресія площі піку від концентрації кверцетину в нормалізованих координатах

Таблиця 4.3

## Характеристики лінійної регресії

Параметри	Значення		
b	4		
s <sub>b</sub>	0,006		
a	0,8		
s <sub>a</sub>	0,4		
s <sub>0</sub>	0,7		
s <sub>0</sub> /b	0,19		
s <sub>Y</sub>	157,1		
r	0,9999		
Reference solution	Average S <sub>St</sub>	C <sub>St</sub>	RSD <sub>St</sub> , %
Reference	391,4	100	0,18

Для вимірювання та розрахунку метрологічної оцінки прецизійності та точності методу було отримано три значення площі піку для розчину порівняння та 27 значень площі піку для модельних розчинів. Розраховували фактичні значення, відношення середніх значень площ піків для кожного з 27 розчинів до середнього значення площ піків розчину порівняння, отримуючи значення  $X_i = (C_i/C_{st}) * 100\%$ ,  $Y_i = (S_i/S_{st}) * 100\%$ , а також значення  $Z_i = (Y_i/X_i) * 100\%$ , яке є концентрацією, знайденою у відсотках від вхідного матеріалу. Результати розрахунків наведені в таблицях 4.4-4.6:

Таблиця 4.4

## Значення дисперсії

Тестові розчини	Назва	Середнє S <sub>i</sub>	C <sub>i</sub>	RSD <sub>i</sub> , %
1	5	19,5	5	0,40
2	10	39,8	10	0,20
3	20	79,7	20	0,09
4	30	117,7	30	0,06
5	60	236,3	60	0,03
6	70	273,6	70	0,03
7	80	313,7	80	0,02
8	90	351,5	90	0,02
9	100	390,9	100	0,02
10	120	469,2	120	0,02

Note: Student (95, 1, 11) = 1,7956

Вимоги до максимально допустимого RSDP: 1,7%.

Розраховане значення зберігається до збіжності вимірювань.

Таблиця 4.5

### Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

Тестові розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$Y_i$	$X_i$	RSD <sub>i</sub> , %	$Z_i$ , %
1	5	19,5	5	4,9	5,00	0,4	99,4
2	10	39,8	10	10,2	10,00	0,18	101,5
3	20	79,7	20	20,3	20,00	0,09	101,7
4	30	117,7	30	30,1	30,00	0,06	100,2
5	60	236,3	60	60,3	60,00	0,03	100,6
6	70	273,6	70	69,9	70,00	0,03	99,8
7	80	313,7	80	80,11	80,00	0,02	100,1
8	90	351,5	90	89,8	90,00	0,02	99,8
9	100	390,9	100	99,8	100,00	0,02	99,8
10	120	469,2	120	119,8	120,00	0,02	99,9

Таблиця 4.6

### Отримані параметри точності та правильності

Параметр	Позначення	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновки
Правильність	$\Delta_z$	1,4	$\leq 3$		Відповідає
Точність	$ Z_{cp} - 100 $	0,29	$\leq 0,45$	$\leq 0,96$	Відповідає за першим критерієм

Note:  $s_z$  (%) = 0,78103; Student (95, 1, 9) = 1,83310

Для оцінки внутрішньої лабораторної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту речовин, що має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу:  $\Delta_z \leq 1,6$  %. Випробування проводять із використанням однієї серії препарату різними аналітиками на одному хроматографі у різні дні із використанням різного мірного посуду

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджено тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ( $\Delta_z = 0,22 \% \leq 1,6 \%$ ).

Таким чином за даними валідаційних досліджень розроблена методика є коректною для поставлених завдань.

#### 4.2 Дослідження коливань рН при проведення тесту «Розчинення»

На цьому етапі необхідно встановити та обговорити профіль рН-залежної розчинності АФІ (кверцетину). АФІ вважається високорозчинною, якщо найвища одноразова доза препарату негайного вивільнення повністю розчиняється в 250 мл буферних розчинів у діапазоні рН 1-6,8 при  $37 \pm 1$  °С. Для доказу необхідно провести дослідження принаймні в трьох буферних розчинах в межах цього діапазону (бажано при рН 1,2; 4,5 та 6,8) та також додатково при рКа, якщо її значення знаходиться у вищезазначеному діапазоні рН. Повторні визначення при кожному значенні рН можуть бути необхідними для досягнення чіткої класифікації розчинності діючої речовини (наприклад, методом струшування колби або іншим обґрунтованим методом). Значення рН кожного буферного розчину необхідно перевіряти до та після введення діючої речовини в буферний розчин [1, 4].

Перед проведенням дослідження профілів розчинення були проведені дослідження зміни рН тих середовищ розчинення які планувалося використовувати для проведення тесту «Розчинення». Дослідження проводили для рН трьох буферних розчинів в вищенаведених умовах для проведення тесту «Розчинення».

Вплив компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища розчинення наведений нижче в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

## Вплив компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення	рН до розчинення	рН після розчинення	рН до розчинення	рН після розчинення
1	1,244	1,244	4,540	4,542	6,771	6,782
2		1,246		4,543		6,780
3		1,243		4,542		6,773
4		1,235		4,540		6,779
5		1,245		4,542		6,775
6		1,245		4,540		6,777
7		1,243		4,543		6,780
8		1,244		4,542		6,765
9		1,243		4,544		6,760
10		1,242		4,545		6,760
11		1,243		4,546		6,775
12		1,240		4,546		6,780

Оскільки досліджуваний препарат не завдає помітного впливу на рН середовища розчинення (відхилення значення рН склало менше 0,05) був зроблений позитивний висновок про можливість використання цих середовищ розчинення для проведення тесту «Розчинення».

#### 4.2.1 Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту «Розчинення»ДФУ

Розчинення таблеток *in vitro* досліджували в діапазоні рН 1-6.8 (рН 1.2, 4.5 та 6.8). Додаткові дослідження які можуть бути необхідними при значеннях рН, в яких діюча речовина має мінімальну розчинність не проводилися. Будь-які поверхнево активні речовини при проведенні експерименту не використовувалися.

Використовували 6 одиниць лікарського засобу для кожного дослідження для проведення статистичної оцінки.

Кількість досліджуваних зразків для проведення зазначених досліджень склала: 6 зразків, всього 1 серія. Кількість вимірювань склала: 156 визначень концентрацій для двох аліквот кожного з трьох середовищ та 13 часових точок відбору.

Таблиця 4.8

<b>Звичайні умови дослідження</b>	
Об'єм середовища	1000 мл
Швидкість обертання лопаті	100 об/хв
Температура:	(37±0,5 °C)
Середовище розчинення	Буферний розчин рН 1,2 Буферний розчин рН 4,5 Буферний розчин рН 6,8
Графік відбору проб:	3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 45 хв;
Відбір проб проводився:	Із компенсацією об'єму середовища розчинення

Методика: 2 таблетки препарату «Квертин». таблетки жувальні по 40 мг, вміщували у дві ємності системи для тестування розчинення «Pharma Test» тип РТ-DТ70, додавали 1000 мл відповідного буфера і проводили тест «Розчинення» за наведеними умовами. При досягненні часу відбору проби, виконували заміну 900 мл відповідного буфера, використовуючи для подальшого кількісного визначення аліквоту відібраних 900 мл проби. Заміну 900 мл проводили 6 разів для кожної судини для парних та непарних точок часового графіку відбору проб. Відбір проб проводили із центру ємності. Об'єм відібраних проб становив 900,0 мл. Наведений об'єм був підібраний експериментальним шляхом щоб уникнути втрати проби в процесі проведення аналізу.

Аліквоту центрифугували протягом 10 хвилин при 10000 об/хв. 1,0 мл верхнього шару обережно відбирали після центрифугування, уникаючи попадання на агломерати нижнього шару, та переносили у віали для хроматографії.

#### 4.2.2 Методологія підготовки зразків

У відповідності з Настановою 42-7.4:2022 [1] подібність профілів розчинення вивчали в середовищах розчинення які є буферними розчинами з рН 1,2; 4,5 та 6,8. У якості буферних розчинів для випробування використовували розчини, рекомендовані ДФУ для тесту «Розчинення» у статті 2.9.3. [4].

Буферний розчин - рН 1,2 (ДФУ) : 250,0 мл 0,2 М розчину *натрію хлориду Р* (11,69 г у 1000,0 мл *води Р*) поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, додають 425,0 мл 0,2 М розчину кислоти хлористоводневої та доводять розчин *водою Р* до позначки.

Буферний розчин - рН 4,5 (ДФУ) : 2,99 г *натрію ацетату Р* розчиняють у *воді Р*, додають 14,0 мл 2 М розчину *кислоти оцтової Р* та доводять об'єм розчину *водою Р* до 1000,0 мл

Буферний розчин - рН 6,8 (ДФУ) : Змішують 250 мл 0,2 М розчину *калію дигідрофосфату Р* і 112 мл 0,1 М розчину *гідроксиду натрію Р*. Доводять об'єм розчину до 1000,0 мл *водою Р*.

Дегазацію всіх середовищ розчинення проводили відповідно до методики дегазації у розділі 2.9.3. ДФУ [4]. Для проведення аналізу попередньо розраховували необхідний об'єм розчинника шляхом поділу дози кверцетину в одній таблетці - 40 мг на величину межі розчинності кверцетину. Межа розчинності кверцетину була попередньо знайдена за допомогою методики розробленої нами раніше та опублікованої [106-107]. Ця величина склала 0,0031 мг/мл. Таким чином, для визначення вивільнення кверцетину в кожному із



середовищ необхідно 13 л розчинника для 13 змін розчинника у склянках для розчинення.

### 4.3 Результати дослідження профілів розчинення

Після проведення досліджень профілів розчинення, отримали наступні дані для препарату «Квертин», таблетки жувальні у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8 (табл. 4.9)

Таблиця 4.9

#### Вивільнення «Квертин» у 3-х різних водних середовищах

Час розчинення, хв	Середовище розчинення - рН 1,2		Середовище розчинення - рН 4,5		Середовище розчинення - рН 6,8	
	Концентрація кверцетина, %	RSD, %	Концентрація кверцетина, %	RSD, %	Концентрація кверцетина, %	RSD, %
3	7,5	11,4	4,1	17,3	2,7	18,8
6	22,5	6,6	13,8	9,6	10,7	9,8
9	32,5	4,9	22,3	8,2	25,0	9,4
12	45,0	7,8	31,2	9,8	33,2	9,2
15	55,0	9,1	58,0	9,9	51,2	8,9
18	65,0	6,8	63,9	8,8	63,9	8,9
21	72,5	5,0	74,7	7,5	71,0	8,1
24	80,0	7,1	83,9	7,7	78,5	7,9
27	87,5	4,2	88,6	6,9	82,0	7,3
30	92,5	5,7	92,2	6,1	88,5	6,9
33	95,0	4,9	96,1	5,8	95,2	6,1
36	97,5	4,8	98,4	5,5	97,2	6,5
39	100,0	4,2	100,0	5,1	100,0	6,1

Ступінь вивільнення кверцетину в розчин розраховували як частку кверцетину, що перейшов у розчин, до початкової наважки, взятої для проведення дослідження та вимірювали у відносних одиницях.

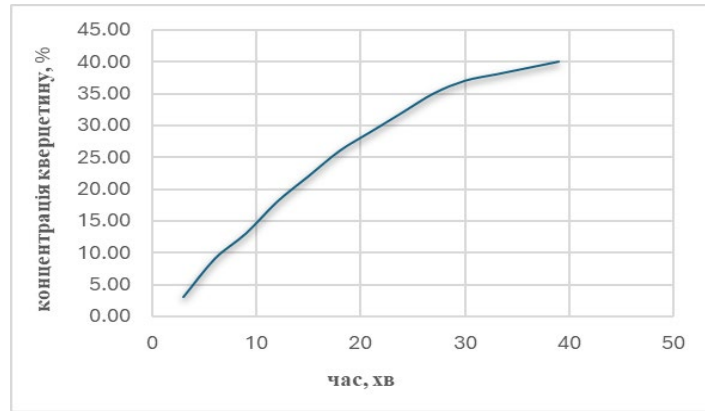


Рис. 4.6 Графік залежності вивільнення кверцетину при рН 1.2 для препарату «Квертин» таблетки жувальні

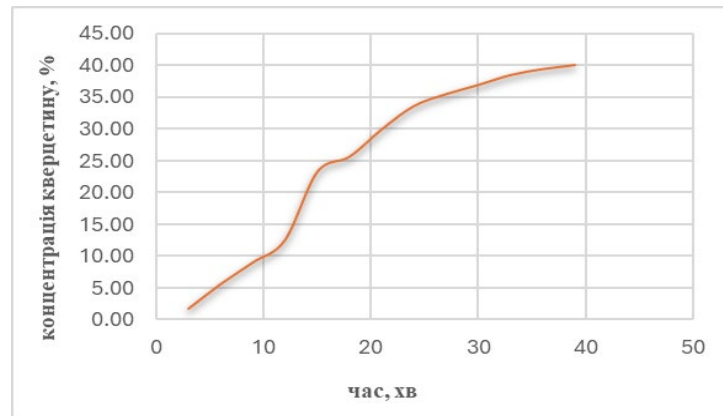


Рис. 4.7 Графік залежності вивільнення кверцетину рН 4.5 для препарату «Квертин» таблетки жувальні

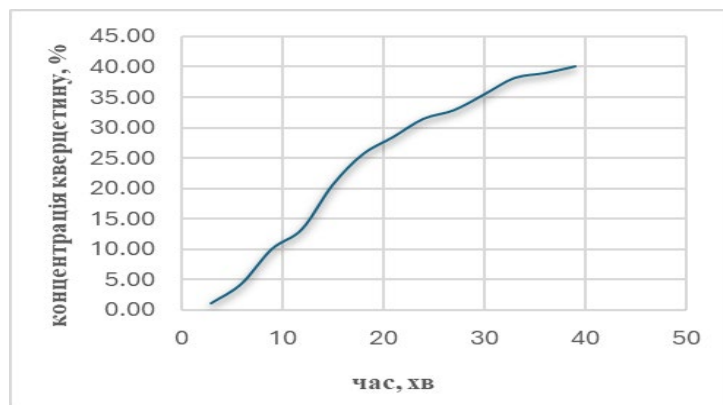


Рис. 4.8 Графік залежності вивільнення кверцетину рН 6.8 для препарату «Квертин» таблетки жувальні

Отримані графічні залежності (рис. 4.6-4.8) дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біовейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%. Вміст кверцетину дорівнює 85% та досягається для всіх вивчених середовищ за 30 хв., що добре корелює з даними отриманими в попередніх дослідженнях для субстанції кверцетину [106-107], де також вміст досягався за 30 хв.

#### 4.4 Результати досліджень препарату «Квертин», що були проведені *in vivo* (надано проф.Зупанцем І.А)

Для встановлення кореляції одержаних нами результатів з даними досліджень *in vivo* ми використали результати дослідження фармакокінетичних властивостей кверцетину та його комплексу з пектином (препарат «Квертин»), проведені в процесі фармацевтичної розробки препарату «Квертин» на кафедрі та клінічної фармації НФаУ під керівництвом проф. І. А. Зупанця. Ці дослідження проведено на 8 безпородних кролях обох статей вагою 2500-3000 г. Кролі були розподілені на 2 дослідні групи по 4 тварини у кожній: 1 група – кролі, що отримували перорально субстанцію кверцетину в дозі 10,0 мг/кг; 2 група – кролі, що отримували перорально комбінацію кверцетину з пектином в дозі 10,0 мг/кг за кверцетином.

Субстанцію кверцетину та дослідну комбінацію вводили внутрішньошлунково за допомогою зонду, одноразово у вигляді суспензій, які виготовлялися з попереднім подрібненням речовин в ступці та використанням необхідної кількості фізіологічного розчину. Забір крові проводили одночасно у всіх тварин через такі інтервали часу: 0,25, 0,5, 1, 2, 4 та 8 год. після введення препаратів.

У якості біоаналітичного методу визначення концентрації кверцетину та його метаболітів (метокси-, сульфатно- та/або глюкуронові кон'югати) у біобразках застосовували ультраефективну рідинну хроматографію з МС-детектором. Загальну концентрацію кверцетину та його метаболітів у плазмі крові відображали у перерахунку на чистий кверцетин і визначали за допомогою рівняння (4.1):

$$C=C(Q)+0,95567 \cdot C(Ir), \quad (4.1)$$

де:  $C(Q)$  – концентрація кверцетину у плазмі крові;  
 $C(Ir)$  – концентрація ізорамнетину у плазмі крові;  
 $0,95567$  – коефіцієнт перерахунку ізорамнетину на кверцетин.

На підставі залежності концентрації кверцетину у плазмі крові від часу, за допомогою загальноприйнятих розрахунків та комп'ютерних програм визначали максимальну концентрацію препарату ( $C_{max}$ ), час досягнення максимальної концентрації ( $T_{max}$ ), площу під кривою ( $AUC_{0-8}$ ), період напіввиведення ( $T_{1/2}$ ) [1].

У зв'язку з цим науковий інтерес представляло вивчення фармакокінетичних параметрів кверцетину на фоні модифікуючого впливу пектину.

Відомо, що одним із модифікаторів фармакокінетичних властивостей кверцетину є пектин, що входить до складу препарату «Квертин». Дана речовина внаслідок особливостей фізико-хімічної взаємодії з кверцетином при розчиненні у водному середовищі шлунково-кишкового тракту, сприяла значному підвищенню всмоктування даного флавоноїду і, внаслідок цього, посиленню його фармакологічної дії. Результати проведених досліджень ілюструють, що внутрішньошлункове застосування кверцетину сприяло появі та коливанню концентрації діючої речовини в крові дослідних тварин обох груп. По мірі

надходження кверцетину до системного кровотоку він піддався активним метаболічним перетворенням у організмі кролів, про що свідчить визначення певного вмісту ряду метаболітів, переважно ізорамнетину.

Зміни концентрації кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у перерахунку на кверцетин у залежності від часу наведено у таблиці 4.10.

З представлених даних видно, що при застосуванні субстанції кверцетину значущу концентрацію діючої речовини в плазмі крові у переважної більшості тварин цієї групи було зареєстровано через 0,25-2 год після введення. У всіх випадках концентрація кверцетину перевищувала вміст ізорамнетину в 2-3 рази, та зміни у концентраціях даних флавоноїдів у плазмі крові тварин були прямо пропорційними й мали однакову інтенсивність. В середньому по групі концентрація кверцетину та його метаболітів у плазмі крові тварин протягом 1 год. після введення препарату утримувалась у межах 340-440 нг/мл.

У тварин, що отримували перорально кверцетин з пектином, спостерігались значно вищі концентрації загального кверцетину та ізорамнетину у плазмі крові, ніж при використанні субстанції. У більшості тварин кверцетин всмоктався інтенсивніше з утворенням максимальної концентрації вже через 15-30 хв після введення. При аналізі середніх значень виявилось, що пікові концентрації кверцетину та його метаболітів утворювались у плазмі тварин протягом перших 15 хв, досягаючи при цьому значень 4 700 нг/мл, і далі поступово зменшувались. Тобто у порівнянні з чистою субстанцією кверцетину спостерігалось значне підвищення всмоктування діючої речовини, але без пролонгації даного процесу.

За розрахунками середніх значень концентрації кверцетину було побудовано фармакокінетичні криві, що відображають залежність загального вмісту кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у сироватці крові піддослідних тварин від часу (рис. 4.9).

З графіків виходить, що фармакокінетична крива (ФК-крива) кверцетину при введенні саме чистої субстанції характеризується стрімким, але незначним,

підвищенням концентрації. Максимальний вміст діючої речовини у 441,7 нг/мл спостерігався вже через 15 хв від дозування. На стадії елімінації ФК-крива показує полого зниження концентрації кверцетину та його метаболітів без наявності виражених піків. При цьому концентрації діючої речовини у крові мали нижчі значення відносно препарату порівняння (таб.4.10).

Таблиця 4.10

### Середні значення вмісту кверцетину (Q) та ізорамнетину (Ir)

Об'єкт дослідження		Час забору крові, год						
		0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Кверцетин (субстанція)	Q	<25,0	324,3	279,3	257,8	176,9	121,1	104,3
	Ir	<25,0	122,8	103,4	92,2	85,1	66,8	36,6
	Сума	<25,0	441,7	378,1	345,9	258,3	184,9	139,3
Кверцетин з пектином	Q	84,1	3778,9	3238,0	2428,8	1783,7	1778,1	490,0
	Ir	6,9	946,3	1326,9	904,2	539,1	608,6	62,0
	Сума	90,7	4683,2	4506,1	3292,9	2298,8	2359,7	549,2

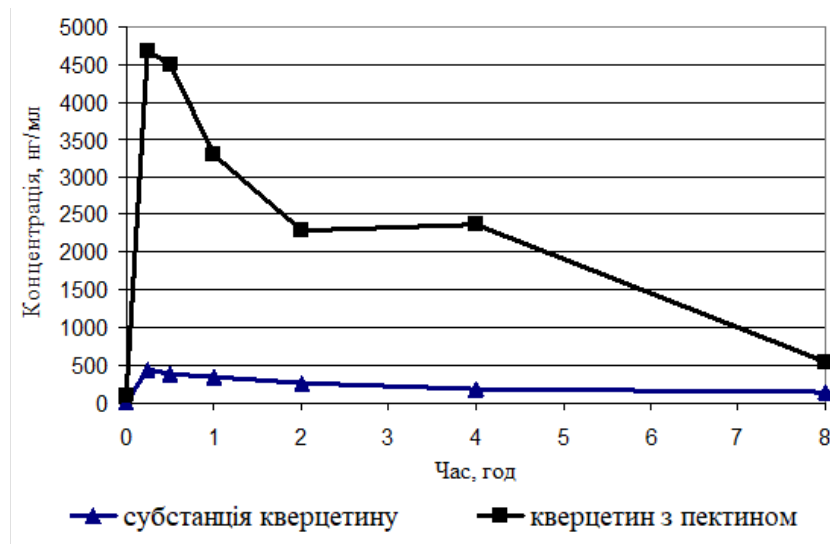


Рис. 4.9 Графіки залежності середніх значень суми концентрацій кверцетину та ізорамнетину в плазмі крові кролів від часу.

При порівняльному аналізі ФК-кривих спостерігається суттєве зміння графіку при комбінуванні кверцетину з пектином (рис. 4.9). На стадії всмоктування відбувається таке ж стрімке підвищення концентрації кверцетину та його метаболітів з досягненням піку протягом перших 15 хв після введення препарату. Завдяки поліпшенню всмоктування максимальна концентрація діючої речовини зросла до 4683,2 нг/мл, що значно перевищує аналогічний показник іншої піддослідної групи. Протягом наступної години вміст флавоноїдів в крові доволі швидко знижувався, але в інтервалі часу від 2 до 4 год крива формувала чітко виражене «плато» на рівні 2300-2400 нг/мл. Надалі ФК-крива поволі знижувалась.

Відповідні фармакокінетичні параметри, розраховані за даними ФК-кривих, представлені у таблиці 4.11:

Таблиця 4.11

**Середні фармакокінетичні показники кверцетину (сума кверцетину та ізорамнетину) у дослідних лікарських формах (n=8)**

Об'єкт дослідження	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , год	$AUC_{0-8}$ , год*нг/мл	$AUC_{0-\infty}$ , год*нг/мл	$AUC_{0-t}$ , %	$K_{el}$ , год <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , год	F, %
Кверцетин (субстанція)	441,7	0,25	1731,8	2694,4	64,3	0,14	4,8	100,0
Кверцетин з пектином	4683,2	0,25	16968,1	19092,0	88,8	0,26	2,7	978,0

При порівнянні фармакокінетичних параметрів особливого значення заслуговують показники площі під кривою  $AUC_{0-\infty}$  та  $AUC_{0-8}$ , оскільки вони відображають кількість діючої речовини, що досягає системного кровообігу тварини взагалі та за досліджуваний період часу. Показник  $AUC_{0-8}$  при застосуванні кверцетину з пектином досягав 16968,1 нг\*год/мл, а значення  $AUC_{0-\infty}$

добігає 19092,0 нг\*год/мл, що у 10 та 7 разів відповідно перевищує рівень даного показника у тварин, які отримували чисту субстанцію кверцетину, та непрямо свідчить про значне збільшення біодоступності флавоноїду.

Розрахунок процентного співвідношення двох показників площі під ФК-кривою виявив, що при комбінуванні з пектином діюча речовина затримувалась в організмі тварин менше (88,9 %), ніж чиста субстанція кверцетину (64,3 %).

Підтвердженням даного факту можна вважати значення показників коефіцієнтів елімінації, що свідчать про інтенсивність виведення кверцетину з організму тварин. Так, значення  $K_{el}$  при введенні кверцетину з пектином знижувалась порівняно з субстанцією у 1,6 разу (0,26 та 0,14 год<sup>-1</sup> відповідно)

У кореляції з показниками  $K_{el}$  знаходились результати розрахунків періоду напіввиведення ( $T_{1/2}$ ). При пероральному застосуванні флавоноїду у вигляді чистої субстанції показник  $T_{1/2}$  дорівнював 4,8 год. У разі комбінування кверцетину з модифікатором розчинності пектином період напіввиведення зменшувався у 1,8 (2,7 год) разу порівняно з чистою субстанцією.

Для наглядного розуміння поліпшення всмоктування кверцетину за допомогою пектину було розраховано показник відносної біодоступності за субстанцією кверцетину ( $F$ , %). Показник  $F$  при застосуванні пектину у якості модифікатору розчинності кверцетину перевищив рівень субстанції у 10 разів (978,0 %). Це дозволяє заключити, що при поєднанні кверцетину з пектином значно більша доза флавоноїду досягає системного кровообігу тварин, ніж при використанні чистої субстанції.

Таким чином, отримані дані дозволяють заключити, що застосування пектину у якості модифікатору розчинності кверцетину у комбінованих пероральних лікарських формах сприяє покращенню всмоктування даного флавоноїду із шлунково-кишкового тракту, збільшуючи його біодоступність. Це буде обумовлювати не тільки спрощення застосування кверцетину, а й підвищення його терапевтичної ефективності.



Отже, комбінування кверцетину з модифікатором розчинності пектином у лікарській формі для перорального застосування дозволяє значно покращити розчинні властивості даного флавоноїду та коректувати його ФК-параметри у відповідності до терапевтичної мети.

#### 4.5 Порівняння одержаних результатів досліджень *in vivo/in vitro*

Кореляція *in vitro/in vivo* (IVIVC) — це прогностична математична модель, що описує зв'язок між властивістю *in vitro* та відповідною реакцією *in vivo*. Основна мета IVIVC — служити заміною для досліджень біоеквівалентності людини(БЕ), що може зменшити кількість досліджень БЕ, які проводяться під час початкового процесу затвердження, а також із певними змінами в масштабах і після затвердження. У вересні 1997 року Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) опублікувало нормативні вказівки, пов'язані з розробкою, оцінкою та застосуванням IVIVC для пероральних лікарських форм із пролонгованим вивільненням. Незважаючи на публікацію цього керівництва, недоліки, пов'язані з IVIVC, все ще ідентифікуються в процесі перегляду скороченої заявки на новий лікарський засіб, тобто реєстрації генеричних ЛЗ. [108-109] Грунтуючись на вимогах документів «Guideline on Investigation of Bioequivalence» та «Questions & Answers: positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party (PKWP)», МОЗ України розробив нормативний документ, який точно визначає процедуру проведення досліджень біодоступності та біоеквівалентності лікарських засобів. Настанова 42-7.4:2022 «Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності» має замінити попередню версію 42-7.3:2020 «Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності» [1]. Настанова враховує рекомендації керівництва ЕМА щодо специфічних вимог до окремих лікарських засобів (Product specific bioequivalence guidance) та керівництва ІСН ЕМА/СНМР/ІСН/493213/2018 щодо вимог до

процедури біолейвер на підставі БСК (ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system base) [108].

Наведені в Настанові процеси описують різні зміни складу ЛЗ, технологічного процесу, обладнання та обсягів виробництва протягом усього життєвого циклу препарату.

Як правило, всі ці зміни обов'язково вимагають дослідження на здорових добровольцях, щоб довести, що новий склад ЛЗ біоеквівалентний старому складу. Виконання цих вимог затримує продаж нового ЛЗ та різко збільшує вартість процесу оптимізації. Виявлення достовірної IVIVC дозволило б проводити оцінку поведінки лікарського засобу *in vivo* шляхом вивчення його кінетики розчинення і, таким чином, оцінювати його взаємозамінність з препаратом порівняння без проведення досліджень біоеквівалентності.

Першим, хто розробив подібну процедуру (IVIVC) було FDA – Управління контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США). Враховуючи ту обставину, що в жодному вітчизняному нормативному документі, що стосується фармацевтичної розробки та виробництва, немає визначення цього поняття, наведемо визначення, запропоновані Фармакопеею США (USP) та FDA [110].

У загальній фармакопейній статті 1088 «Оцінка лікарських *форм in vivo* та *in vitro*» Фармакопеї США (USP 32–NF 27) наводиться визначення: «IVIVC – це встановлення кількісного взаємозв'язку між біологічною (C<sub>max</sub> або AUC) та фізико-хімічною властивістю (профіль розчину лікарської форми». У посібнику FDA дано визначення: «IVIVC – це математична модель, що описує взаємозв'язок між будь-яким параметром *in vitro* твердої дозованої лікарської форми для внутрішнього застосування (зазвичай швидкістю або ступенем вивільнення) та відповідним параметром *in vivo* (концентрацією речовини в плазмі крові)» [110].

FDA виділяють три основних рівня кореляції - A, B та C [110]. Рівень кореляції A є найвищим. При цьому визначають зв'язок між профілем розчинення та фармакокінетичною кривою.

Якщо було отримано кореляцію А, крива розчинення *in vitro* може бути достовірною заміною випробувань *in vivo*. В цьому випадку, біоеквівалентність лікарських засобів за змінами: методу виробництва, джерела сировини, модифікаціях складу допоміжних речовин, місця виробництва може бути доведена без досліджень *in vivo* [110]. Якщо встановлено кореляцію рівня В, повинен виявлятися взаємозв'язок між точковими параметрами *in vitro* та *in vivo* – середнім часом вивільнення *in vitro* ( $MDT_{in\ vitro}$ ) та середнім часом утримання (MRT), (рідше) середнім часом вивільнення *in vivo* ( $MDT_{in\ vivo}$ ), середнім часом всмоктування *in vivo* ( $MA_{in\ vivo}$ ). Кореляція рівня С визначає взаємозв'язок між однією точкою профілю розчинення ( $T_{50\%}$ ,  $T_{90\%}$ ) та одним фармакокінетичним параметром ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC) [110].

Згідно до вимог монографії USP нами були проведені дослідження *in vitro* для лікарського засобу «Квертин» таблетки жувальні, по 40 мг 3 блістера по 10 шт. виробництва «ПАТ НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ», Україна, який був обраний як об'єкт дослідження та як приклад розробки нового препарату згідно із вимогами настанови були проведені всі стадії досліджень, наведених вище.

У розділі 4 наведено результати дослідження кривих вивільнення кверцетину у трьох середовищах із рН 1.2, 4.5 та 6.8.

Для вимірювання було розроблено та валідовано методику кількісного визначення кверцетину для всіх середовищ, використаних для проведення дослідження. Також було попередньо вивчено вплив рН цих середовищ на концентрацію кверцетину в розчинах і доведено їх стабільність, як це потрібно настановою.

Отримані результати вивільнення кверцетину - профілі розчинення *in vitro* були побудовані в координатах - концентрація (% речовина, що розчинився) / час (год.) для середовища з рН 6.8.

Під час розробки процедури IVIVC вивчали поведінку ЛЗ у середовищі розчинення з рН 6.8. яке мало найбільш дискримінуючі властивості до процесу вивільнення кверцетину з препарату.

Для досліджуваних застосовували одну і ту саму методику тесту «Розчинення». Випробування проводили на приладі «Мішалка з лопаттю» при 100 об./хв. Контролювали рН середовища розчинення з точністю 0,05. Його значення не повинно було перевищувати 6.8.

Незважаючи на те, що ми проводили тест «Розчинення» для ЛЗ, що містять речовину з низькою розчинністю, додавання в середовище розчинення поверхнево-активних речовин (наприклад, 1% лаурилсульфату натрію) не використовувалось.

Коефіцієнти варіації (CV, %) не повинні перевищувати 10% для кожної часової точки.

Згідно з інформацією наведеної в посібнику FDA процес вивчення кореляції рівня А полягає у отриманні профілів розчинення *in vitro* в координатах – концентрація (% розчиненої лікарської речовини)/час (год.) безпосередньо накладають на криві *in vivo* у координатах – концентрація (нг/мл)/час (год.) та подальшій побудові графіка кореляційної залежності рівня А в координатах - всмоктування *in vivo* (%)/*in vitro* (%) за допомогою математичної моделі.

Використовуючи інформацію про вивчення біодоступності препарату «Квертин» таблетки жувальні, по 40 мг 3 блістери по 10 шт. виробництва «ПАТ НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ», Україна методом *in vivo* була побудована крива зміни концентрації кверцетину від часу в координатах: концентрація (нг/мл)/час (година).

Результати вивчення вивільнення кверцетину *in vivo* (нг/мл)/*in vitro* (%) наведено у таблиці 4.12:

Таблиця 4.12

Результати вивчення вивільнення кверцетину *in vivo* (нг/мл)/*in vitro* (%)

Час, хв	Вивільнення кверцетину <i>in vitro</i> (%)	Вивільнення кверцетину <i>in vitro</i> (нг/мл)
0	4,09	84,10
10	22,31	446,25
15	57,96	1159,29
20	74,70	1494,17
25	83,87	1677,46
30	92,16	3238,00
Коефіцієнт кореляції		0,9 пряма залежність

Використовуючи стандартне програмне забезпечення Microsoft Excel, було проведено кореляційний аналіз двох отриманих залежностей. Отриманий результат 0,9. Цей показник відображає високу залежність першої величини другої. При перевірці значущості кореляційного коефіцієнта нульова гіпотеза полягала у цьому, що показник має значення 0, а альтернативна немає. Для перевірки застосовується нижче наведена формула:

$$t_r = \frac{r \cdot \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (4.2)$$

Нижче наведено графіки профілів розчинення кверцетину та залежності середніх значень концентрацій кверцетину у плазмі крові кролів від години (рис. 4.10 та 4.11).

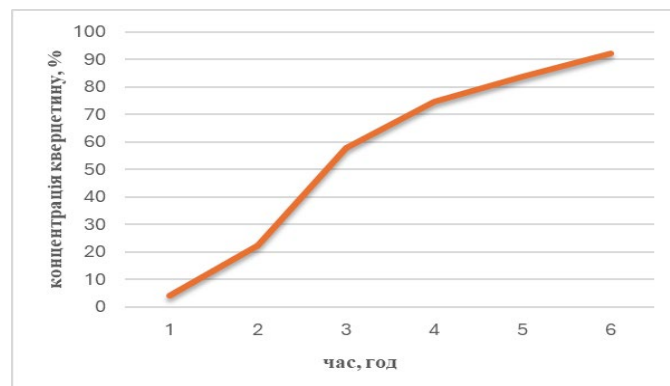


Рис. 4.10 Графік залежності вивільнення кверцетину рН 6.8 для препарату «Квертин» таблетки жувальні

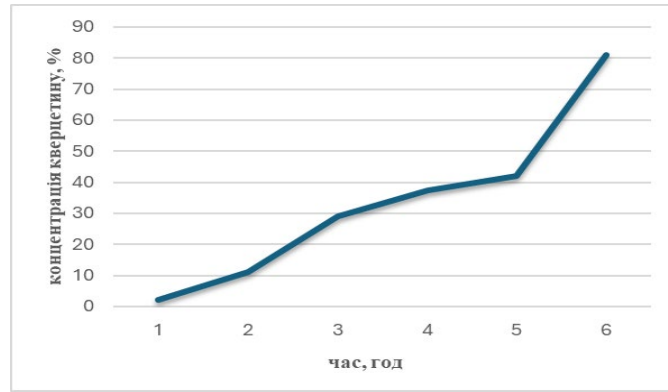


Рис. 4.11 Графік залежності середніх значень концентрацій кверцетину в плазмі крові кролів від часу.

Відповідно до описаної вище процедури було побудовано графік кореляційної залежності рівня А координатах – всмоктування *in vivo* (%) / *in vitro* (%) (рис.4.12).

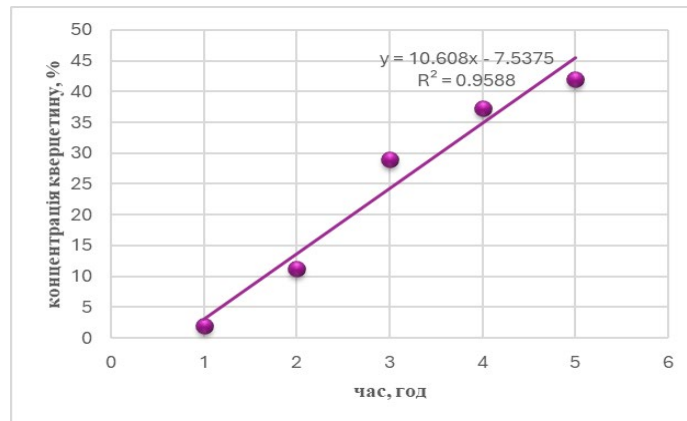


Рис. 4.12 Графік кореляційної залежності рівня А в координатах – вивільнення кверцетину *in vivo* (%) / *in vitro* (%).

Для отриманої залежності було розраховано коефіцієнт кореляції. Його значення становило 0,9588 що свідчить про значний кореляційний зв'язок аналізованих параметрів вивільнення кверцетину методами *in vivo/in vitro*.

Згідно до положень FDA, IVIVC можлива в тому випадку, якщо лімітуючою стадією є стадія вивільнення з лікарської форми та розчинення [110]. Як правило ЛЗ, що містять речовини 2-го класу БСК підпадають під цей випадок. IVIVC для

препаратів, що містять речовини 1-го класу БСК, виконується якщо швидкість випорожнення шлунку перевищує швидкість розчинення у випробуваннях *in vitro*, тобто для пролонгованих форм ЛЗ. IVIVC, для ЛЗ що містять речовин IV класу БСК, може бути якщо процес розчинення для них має меншу швидкість, ніж процес абсорбції в ШКТ.

Наявність для вимірних результатів кореляції *in vivo/in vitro* дозволяє стверджувати, що незважаючи на те, що IVIVC в першу чергу може бути застосовна до пролонгованих лікарських засобів, її також можна виявити і для ЛЗ що містять речовини IV класу БСК, з негайним вивільненням. Ймовірно, для випадку кверцетину це пояснюється перевищенням швидкості адсорбції кверцетину над швидкістю його розчинення.

Наявність *in vivo/in vitro* кореляції може стати ефективним прогностичним інструментом для оцінки поведінки кверцетину в препараті «Квертин» таблетки жувальні, по 40 мг 3 блістери по 10 шт. виробництва «ПАТ НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ», Україна в умовах *in vivo* на підставі профілів розчинення препарату *in vitro*, що дозволяє різко знизити матеріальні та часові витрати у подальших дослідженнях препарату.

#### Висновки до розділу 4

1. Розроблено нову методику кількісного визначення кверцетину в умовах тесту «Розчинення» таблеток «Квертин» з використанням методу ВЕРХ-МС.

2. Було проведено валідацію розробленої методики. У процесі валідації методики кількісного визначення кверцетина в таблетках препарату «Квертин», таблетки жувальні по 40 мг були вивчені валідаційні характеристики методики за методом стандарту: правильність, лінійність, прецизійність, специфічність та внутрішньолабораторну прецизійність.

3. Досліджено вплив рН на проведення тесту «Розчинення». Встановлено, що допоміжні речовини лікарського засобу не завдають значного впливу на рН середовища (менше 0,05).

4. Вперше отримано профілі розчинності кверцетину у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8, для препарату «Квертин», таблетки жувальні по 40 мг згідно до вимог тесту «Розчинення» ДФУ та Настанови БСК. Отримані графічні залежності дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біокейвера, відносно стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%.

5. Проаналізовано фармакокінетичні криві, одержані в процесі фармацевтичної розробки препарату «Квертин» в дослідках на тваринах.

6. Вперше проведено кореляційні дослідження даних одержаних в ході фармацевтичної розробки в експериментах *in vitro*/ *in vivo* для препарату «Квертин» з використанням методології IVIVC. Кореляційна залежність рівня А – всмоктування *in vivo* (%) / *in vitro* (%) характеризувалось високим коефіцієнтом кореляції 0,9588 що свідчить про значний кореляційний зв'язок аналізованих параметрів вивільнення кверцетину.

7. Наявність *in vivo/in vitro* кореляції може стати ефективним прогностичним інструментом для оцінки поведінки кверцетину в препараті «Квертин» в умовах *in vivo* на підставі профілів розчинення препарату *in vitro*, що дозволяє значно зменшити матеріальні та часові витрати у подальших дослідженнях препарату.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Khanina, N. V.; Georgiyants, V. A.; Khanin, V. A.; Zupanets, I. A. The New Method to Study the Kinetics of Release of Hardly Soluble API from Solid Oral Dosage Forms on the Example of Quercetin. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. № 21 (3). P. 50 – 60.



## РОЗДІЛ V

### ВИВЧЕННЯ ПОДІБНОСТІ МІЖ РІЗНИМИ СКЛАДАМИ ПРЕПАРАТІВ НА ПРИКЛАДІ ВИВЧЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ З ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «СИНУПРЕТ» ЗА ПРОЦЕДУРОЮ БІОВЕЙВЕРА

Оригінальний препарат «Синупрет» (Sinupret®), (виробництва Bionorica, Німеччина) (табл. 5.1) у двох лікарських формах був обраний в якості об'єкту для проведення дослідження із використанням розробленої аналітичної методики для демонстрації в деяких випадках подібності між різними складами препаратів та референтним лікарським засобом (відмова від проведення досліджень біоеквівалентності *in vivo*, наприклад, зміни, що можуть бути протягом дії реєстраційного посвідчення, зміни препарату під час розробки та зміни генеричних лікарських засобів; див. розділ 4.2 та Додаток III цієї настанови) [1]. Цей розділ описує також проведення порівняльних досліджень розчинення оригінального лікарського засобу «Синупрет» екстракт №10 та оригінального препарату «Синупрет-форте» таблетки №50, (виробництва Bionorica, Німеччина), у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8, порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору  $f_2$ .

Таблиця 5.1

## Склад досліджуваних ЛФ препарату «Синупрет»

Назва компоненту	Вміст компоненту
<b>«Синупрет-форте» таблетки, що вкриті оболонкою</b>	
<p><i>Діючі речовини:</i> 1 таблетка містить висушені лікарські рослини у вигляді порошку:  кореня горечавки,  квіток первоцвіту з чашечкою,  трави щавлю,  квіток бузини,  трави вербени</p> <p><i>Допоміжні речовини:</i> кальцію карбонат, олія рицинова, кремнію діоксид колоїдний безводний, еудрагіт Е100, желатин, глюкози сироп, лактоза, магнію оксид, крохмаль картопляний, кукурудзяний декстрин, віск монтановий гліколевий, повідон К25, вода очищена, шелак, сорбіт, кислота стеаринова, сахароза, тальк, титану діоксид, натрію карбонат безводний, барвник Е104, барвник Е132.</p>	<p>6,0 мг  18,0 мг  18,0 мг  18,0 мг  18,0 мг</p>
<b>«Синупрет» екстракт таблетки, що вкриті оболонкою</b>	
<p>1 таблетка містить 160 мг сухого екстракту (3-6: 1) з кореня тирличу, квіток первоцвіту з чашечкою, трави щавлю, квіток бузини, трави вербени (1: 3: 3: 3: 3) (екстрагент етанол 51 % (м / м))</p> <p><i>Допоміжні речовини:</i> мальтодекстрин, кремнію діоксид колоїдний безводний, акація (гуміарабік), кальцію карбонат (Е170), целюлоза порошкоподібна, целюлоза мікрочастична, магнію стеарат, кремнію діоксид колоїдний безводний, віск карнаубський, міді хлорофілін (Е141), глюкози розчин, декстрин, гіпромелоза, алюмінію гідроксид, індигокармін (Е132), рибофлавін (Е101), кислота стеаринова, сахароза, тальк, титану діоксид (Е171).</p>	

«Синупрет екстракт» є складним комбінованим препаратом, до складу якого входять кілька видів різної лікарської сировини (екстракт кореню тирлича жовтого (*Gentiana lutea*), квітки з чашечками первоцвіту весняного (*Primulae veris*), трава щавлю звичайного (*Rumex acetosa*), квітки бузини чорної (*Sambucus nigra*), трава

вербени лікарської (*Verbena officinalis*)). Така складна рослинна матриця містить велику кількість біологічно активних речовин, однією з яких є флавоноїд кверцетин. Згідно з викладеними вище критеріями вибору речовини маркера, кверцетин найповніше відповідає вимогам і був обраний речовиною-маркером для проведення досліджень кінетики вивільнення та вивчення профілів подібності у препараті «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте».

Із наведених у таблиці 5.1 даних можна зробити висновок про те, що дві лікарські форми мають схожий склад як компонентів, що зумовлюють фармакотерапевтичний ефект, так і допоміжних речовин. Це грає важливу роль у рамках відповідності вимогам Настанови з проведення процедури біоверифікації, яка була використана у даному дослідженні у повному форматі [1].

#### 5.1 Методика кількісного визначення кверцетину методом ВЕРХ-МС

Для проведення досліджень і вимірювань використовували аналітичну методику, що була розроблена для визначення кверцетину та наведена у РОЗДІЛІ IV.

За обраних нами умов були одержані хроматограми повного іонного струму для зразків в трьох середовищах, із значеннями рН 1.2, 4.5 та 6.8 які планувалося використовуватися для проведення тесту «Розчинення» (рис.5.1-5.4).

У якості стандартного зразку нами була використана субстанція кверцетину, оскільки невизначеність аналізу не перевищує 3%.

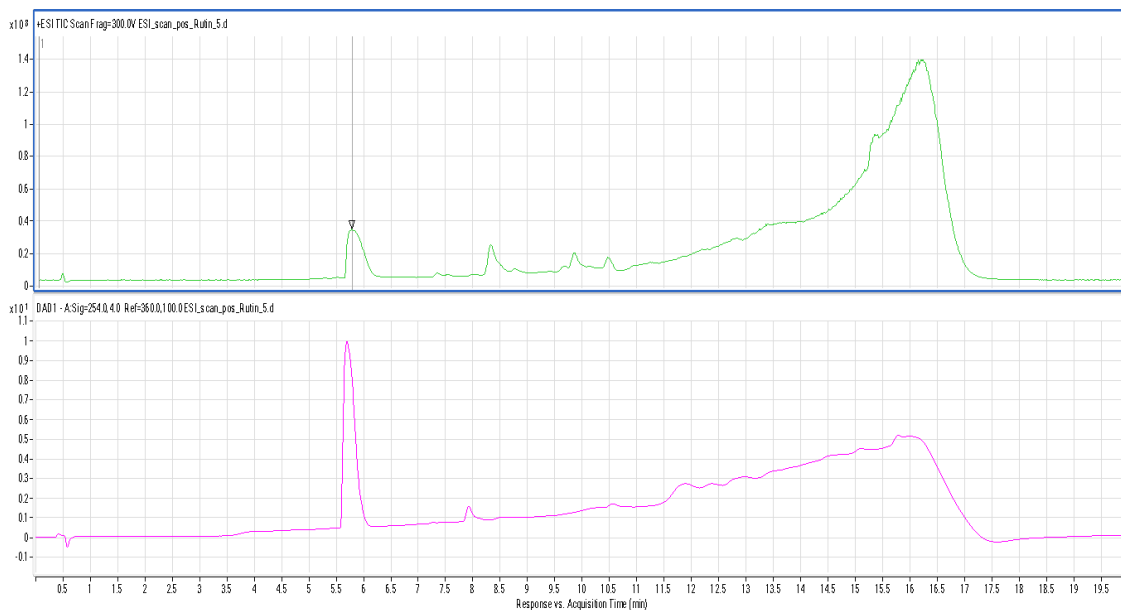


Рис. 5.1 Типова хроматограма розчину стандартного зразку кверцетину

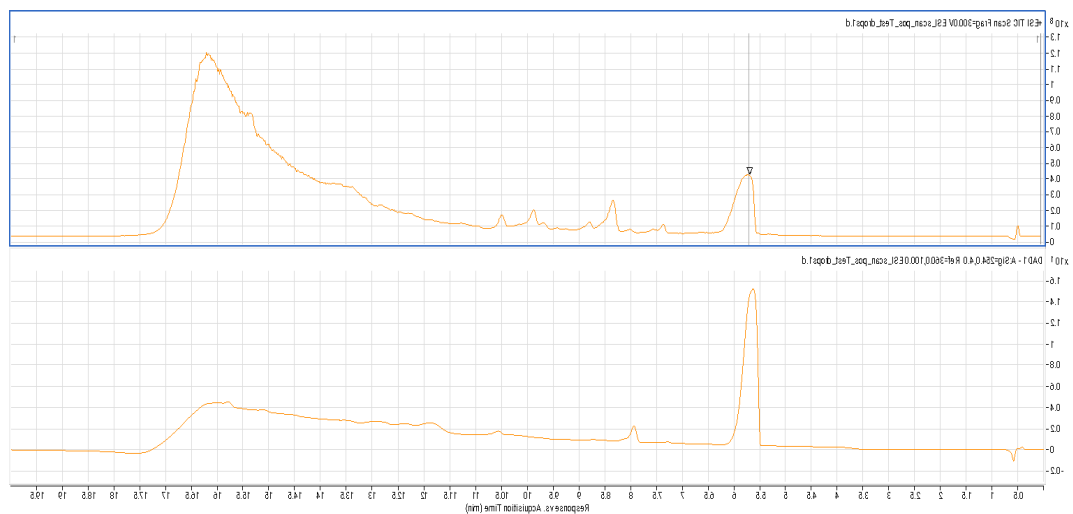


Рис. 5.2 Типова хроматограма досліджуваного розчину препарат «Синупрет» екстракт, таблетки, вкриті оболонкою

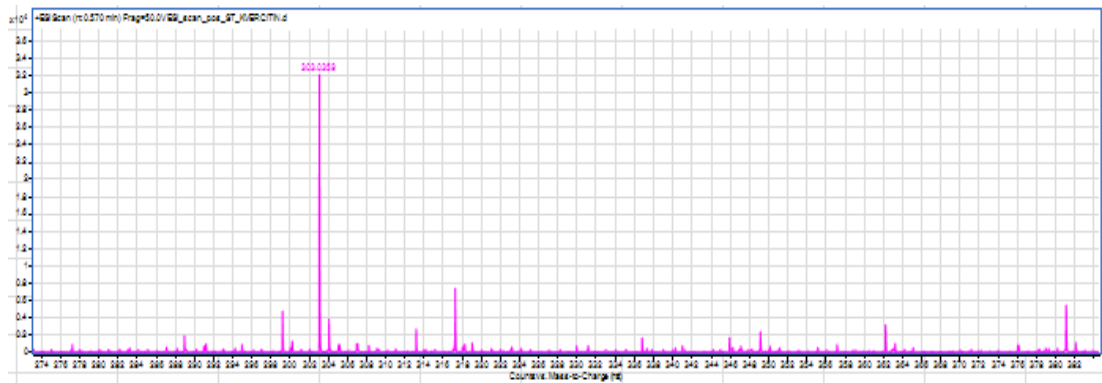


Рис. 5.3 Типовий мас-спектр розчину стандартного зразку кверцетину

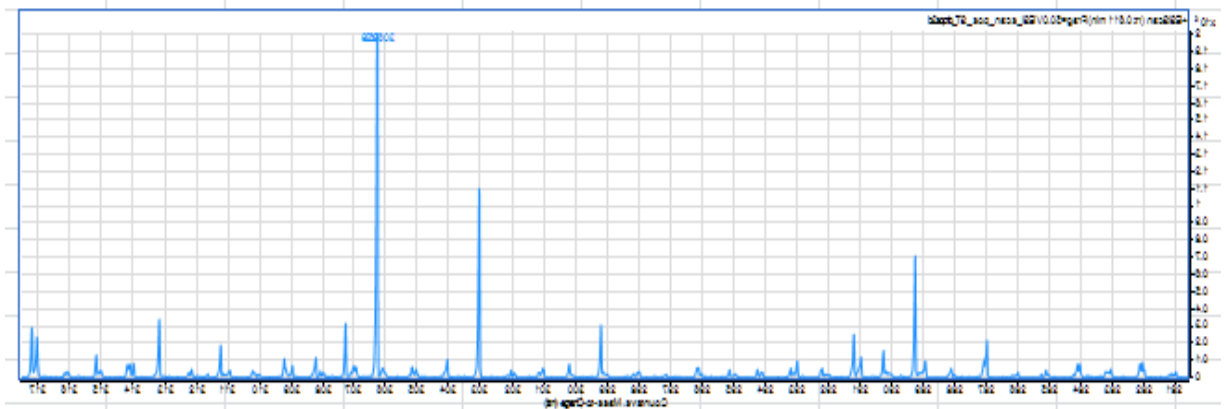


Рис. 5.4 Типовий мас-спектр кверцетину у препарат «Синупрет» екстракт, таблетки, вкриті оболонкою

## 5.2.Валідація розробленої методики

Для того, щоб використовувати цю методику при проведенні випробувань по визначенню вивільнення кверцетина з препарату «Синупрет» екстракт, таблетки, вкриті оболонкою, згідно зі схемою біовейвера для трьох середовищ розчинення з рН 1.2, 4.5 та 6.8, була проведена валідація методики як методу кількісного визначення зі значенням максимальної невизначеності 1,6%. Валідація методики проводилась за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, прецизійність правильність та внутрішньолабораторна прецизійність [4].

Оскільки використовуваний в методиці метод ВЕРХ є специфічним, для доказу того, що методика є специфічною достатньо, щоб виконувались усі вимоги до критеріїв лінійності, правильності, прецизійності та внутрішньо лабораторної прецизійності.

Модельні розчини для хроматографування готували за аналітичною методикою наведеною раніше, що наведена у РОЗДІЛІ III. Методика приготування стандартного розчину. Холостий розчин готували аналогічно досліджуваному розчину препарату.

*Лінійність.* Оцінку лінійності проводили в діапазоні (80-120%) застосування методики за стандартною методикою. Дослідження характеру залежності сигналу від концентрації проводили з використанням 9 модельних розчинів для аналізу з точними концентраційними вагами: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120% (Табл. 5.2). У той же час концентрація, прийнята за 100%, була концентрацією кверцетину, яка знаходиться в середині діапазону, що охоплює мінімальну та максимальну концентрації кверцетину [4].

Вимоги до параметрів лінійності розраховані згідно вимог ДФУ [4] до тесту «Розчинення» (табл. 5.2-5.5).

Таблиця 5.2

#### Концентрації досліджуваних розчинів

№	С, %
1	80
2	90
3	100
4	110
5	120

$RSD_y$ : 18,2588%

Вимоги до невизначеності результатів аналізу: 3%

Вимоги до  $RSD_0 / b$ : 1,03%

Student (95, 1, 4) = 2,92

Вимоги до  $r$ : 0,99842

Вимоги до  $a$ : 4,8%

Таблиця 5.3

**Вихідні дані для розрахунку за результатами тесту «Розчинення»**

№	Назва зразка	S	Статус	Концентрація, %
1	Reference	4573292	RS	1,00E+00
2	Reference	4573293	RS	1,00E+00
3	80	2882401	test	8,00E-01
4	80	2882404	test	8,00E-01
5	90	3859591	test	9,00E-01
6	90	3859597	test	9,00E-01
7	110	6243391	test	1,10E+00
8	110	6243397	test	1,10E+00
9	120	7276441	test	1,20E+00
10	120	7276444	test	1,20E+00

Таблиця 5.4

**Значення дисперсій**

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$RSD_{i, \%}$
1	80	2882402,5	0,8	7,36E-5
2	90	3859594	0,9	0,00010992
3	110	6243394	1,1	6,795E-5
4	120	7276442,5	1,2	2,915E-5

Рівноточність  $RSD_j$  за модифікованим критерієм Бартлетта

Процентна точка  $m$  (таблична): 9,49

Критерій Бартлетта: 3,56

*Висновок:* дисперсії відрізняються незначущі, вибірки рівноточні.

Student (95, 1, 5) = 2,015.

Вимоги щодо максимально припустимого  $RSD_p$ : 1,49%.

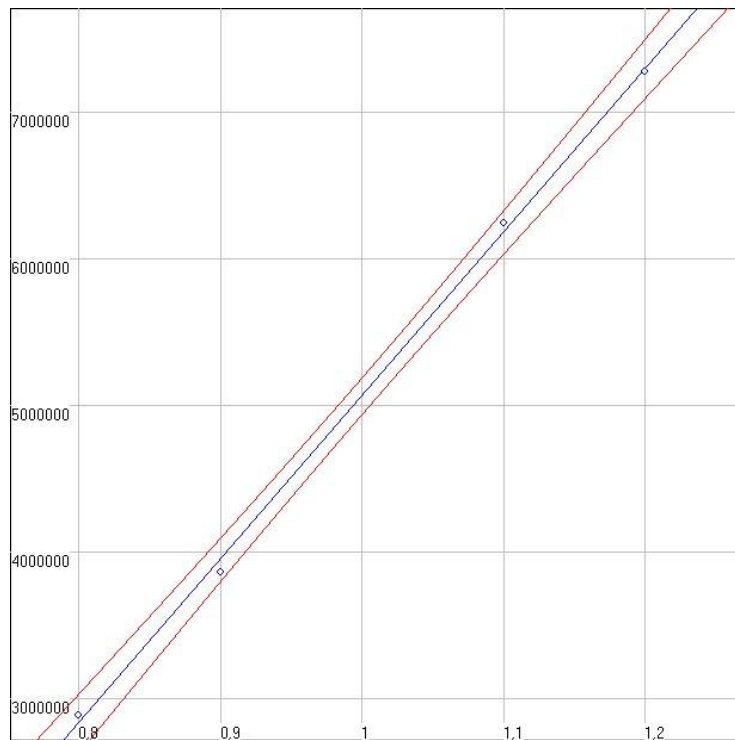
Розраховане значення об'єднаного стандартного відхилення  $RSD_p$ : 0,00%

*Висновок:* Вимоги до збіжності вимірювань витримуються.

Таблиця 5.5

Таблиця для середніх значень

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	RSD $i, \%$
1	80	2882402,50	0,8	0,00
2	90	3859594,00	0,9	0,00
3	110	6243394,00	1,1	0,00
4	120	7276442,50	1,2	0,00

Рис. 5.5 Графік залежності середніх значень  $S_i = a + b \times C_i$ 

Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ [4]. Побудова калібрувального графіка здійснювалась у нормованих координатах (рис. 5.6). Для кожного з дев'яти зразків розчинів розраховували середні значення площі піку ( $S_i$ ). Отримані результати оброблено методом найменших квадратів для прямої  $Y = b \cdot x + a$ . Розраховані статистичні значення  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (кінцеве стандартне відхилення) і  $r$  (коефіцієнт кореляції) наведені в таблиці 5.6-5.9.



У нашому випадку вимоги до параметрів лінійної регресії виконуються на всьому діапазоні застосування методики (80 - 120%).

Таблиця 5.6

**Параметри лінійності і критерії (для середніх значень)**

Параметри	Значення
b	11171880,0
s <sub>b</sub>	2,7143E5
a	-6,1E6
s <sub>a</sub>	2,748E5
s <sub>0</sub>	85833
s <sub>0</sub> /b	0,0077
s <sub>Y</sub>	2040900,50
r	0,99941

Таблиця 5.7.

**Таблиця для приведених значень для розчину порівняння**

Розчин порівняння	Середнє S <sub>st</sub>	C <sub>st</sub>	RSD <sub>st</sub> ,%
Reference	4573292,5	1	1,55E-5

Таблиця 5.8

**Таблиця для приведених значень для випробовуваних розчинів**

Випробовувані розчини	Назва	Середнє S <sub>i</sub>	C <sub>i</sub>	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub>	RSD <sub>i</sub> ,%	Z <sub>i</sub> ,%
1	2	3	4	5	6	7	8
1	80	2882402,50	0,8	63,03	80,00	0,00	78,78
2	90	3859594,00	0,9	84,39	90,00	0,00	93,77
1	2	3	4	5	6	7	8
3	110	6243394,00	1,1	136,52	110,00	0,00	124,11
4	120	7276442,50	1,2	159,11	120,00	0,00	132,59

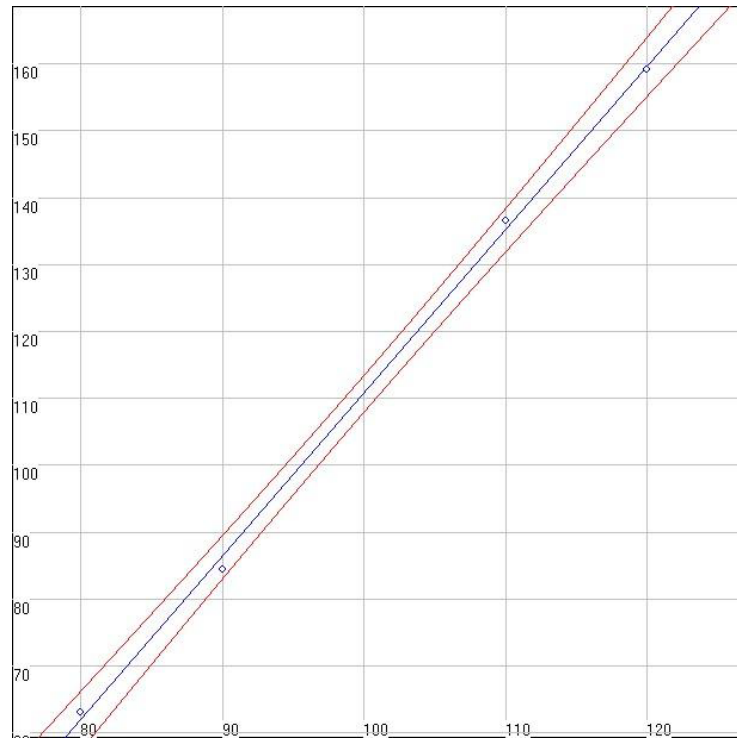


Рис. 5.6 Графік залежності приведених значень  $Y_i = a + b \times X_i$ :

Таблиця 5.9

**Параметри лінійності і критерії (для приведених означень)**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	2,4429	-	-	-
s <sub>b</sub>	0,05935	-	-	-
a	-1,3E2	≤   17,5	≤   4,8	витримуються за першим критерієм
s <sub>a</sub>	6,0088	-	-	-
s <sub>0</sub>	1,8768	-	-	-
s <sub>0</sub> /b	0,77	≤   1,03	-	витримуються
s <sub>Y</sub>	18,26	-	-	-
r	0,9989	≥   0,99842	-	витримуються

Student (95, 1, 2) = 2,92

Висновок: Вимоги до r витримуються.

Для оцінки правильності та збіжності методик розраховували співвідношення знайдено/введено для вказаних модельних зразків. Виходячи із

значення величини довірчого інтервалу одиничного значення співвідношення знайдено/введено, робили висновок про збіжність результатів аналізу. Прецизійність підтверджували незначущою систематичною похибкою. Для цього розраховували критерій Стьюдента (Таб. 5.10-5.12).

Таблиця 5.10

Таблиця для приведених значень

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$Y_i$	$X_i$	$Z_i, \%$
1	80	2882402,5	63,03	80,00	78,78
2	90	3859594	84,39	90,00	93,77
3	110	6243394	136,52	110,00	124,11
4	120	7276442,5	159,11	120,00	132,59

Таблиця 5.11

Параметри правильності

	Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
Правильність	$ Z_{cp} - 100 $	$ 7,3 $	$\leq 30$	$\leq 0,96$	витримуються за першим критерієм

$$s_z(\%) = 25,287$$

$$\text{Student}(95, 1, 3) = 2,35340$$

Висновок: Вимоги до правильності витримуються за першим критерієм

Таблиця 5.12

МВ / МКВ

Межа виявлення, %	Межа кількісного визначення, %
МВ = 8,1	МКВ = 24,6

Висновок: Параметри придатності, що наведені у методиці, є достатніми та дозволяють коректно та стабільно отримувати достовірні результати кількісного визначення кверцетину в розчинах з концентрацією 9 – 10 мг у одній таблетці.

Для оцінки внутрішньолабораторної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту

речовин, що має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу:  $\Delta_z \leq 1,6 \%$ . Випробування проводять із використанням однієї серії препарату різними аналітиками на одному хроматографі у різні дні із використанням різного мірного посуду.

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджено тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ( $\Delta_z = 0,72 \% \leq 1,6 \%$ ).

Ніяких змін під час проведення валідаційних процедур не впроваджувалися до затвердженого валідаційного плану. Додаткових випробувань не проводилось.

### 5.3 Вплив рН на проведення тесту «Розчинення»

Перед проведенням дослідження профілів розчинення були проведені дослідження зміни рН тих середовищ розчинення, які планувалося використовувати для проведення тесту «Розчинення» для препарату «Синупрет». Дослідження проводили для рН трьох буферних розчинів в вищенаведених умовах для проведення тесту «Розчинення» при рН 1.2, 4.5 та 6.8. Значення рН кожного буферного розчину необхідно перевіряти до та після введення діючої речовини в буферний розчин [4].

Вплив компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища розчинення наведений нижче в таблицях 5.13-5.15:

Таблиця 5.13

**Вплив «Синупрет екстракт» на середовище з рН 1.2**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	1,244	1,244
2		1,246
3		1,243
1		3
4		1,235
5		1,245
6		1,245
7		1,243
8		1,244
9		1,243
10		1,242
11		1,243
12	1,240	

Таблиця 5.14

**Вплив «Синупрет екстракт» на середовище з рН 4.5**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	4,540	4,542
2		4,543
3		4,542
4		4,540
5		4,542
6		4,540
7		4,543
8		4,542
9		4,544
10		4,545
11		4,546
12		4,546

Таблиця 5.15

**Вплив «Синупрет екстракт» на середовище з рН 6.8**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	6,771	6,782
2		6,780
3		6,773
4		6,779
5		6,775
6		6,777
7		6,780
1		3
8		6,765
9		6,760
10		6,760
11		6,775
12	6,780	

Оскільки досліджуваний препарат «Синупрет екстракт», таблетки, вкриті оболонкою не завдає помітного впливу на рН середовища розчинення (відхилення значення рН склало менше 0,05) був зроблений позитивний висновок про можливість використання цих середовищ розчинення для проведення тесту «Розчинення».

5.4 Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту «Розчинення»ДФУ

Розчинення таблеток *in vitro* досліджували в діапазоні рН 1 - 6.8 (рН 1.2, 4.5 та 6.8). Додаткові дослідження які можуть бути необхідними при значеннях рН, в яких діюча речовина має мінімальну розчинність не проводилися. Будь-які поверхнево активні речовини при проведенні експерименту не використовувалися (Таб. 5.16).

Використовували 6 одиниць лікарського засобу для кожного дослідження для проведення статистичної оцінки.

Кількість досліджуваних зразків для проведення зазначених досліджень складала: 6 зразків, всього 1 серія. Кількість вимірювань складала: 144 визначень концентрацій для двох аліквот кожного з трьох середовищ та 4 часових точок відбору.

Таблиця 5.16

### Звичайні умови дослідження для тесту «Розчинення»

Об'єм середовища	1000 мл
Швидкість обертання лопаті	100 об/хв
Температура:	(37±0,5 °C)
Середа розчинення	Буферний розчин рН 1,2
	Буферний розчин рН 4,5
	Буферний розчин рН 6,8
Графік відбору проб:	5, 10, 15, 30 хв;
Відбір проб проводився:	Із компенсацією об'єму середовища розчинення

*Методика:* 2 таблетки препарату «Синупрет екстракт», таблетки, вкриті оболонкою, вміщували у дві ємності системи для тестування розчинення «Pharmatest» тип РТ-ДТ 70, додавали 1000 мл відповідного буфера і проводили тест «Розчинення» за наведеними умовами. При досягненні часу відбору проби, виконували заміну 900 мл відповідного буфера, використовуючи для подальшого кількісного визначення аліквоту відібраних 900 мл проби. Відбір проб проводили із центру ємності. Об'єм 900,0 мл, що відбирається, було встановлено експериментально так, щоб забезпечувати меншу похибку при відборі проби. Об'єм точно відміряли за допомогою циліндру аналітичного мірного, ємністю 1000,0 мл (клас точності - А).

Аліквоту центрифугували протягом 10 хв. при 10000 об/хв. 1,0 мл верхнього шару обережно відбирали після центрифугування, уникаючи попадання на агломерати нижнього шару, та переносили у віали для хроматографії.

## 5.5 Методологія підготовки зразків

У відповідності із Настановою 42-7.4:2022 [1] подібність профілів розчинення вивчали в середовищах розчинення, які є буферними розчинами з рН 1,2; 4,5 та 6,8. У якості буферних розчинів для випробування використовували розчини, рекомендовані ДФУ для тесту «Розчинення» у статті 2.9.3. [4] .

Для проведення аналізу попередньо розраховували необхідний об'єм розчинника шляхом поділу дози кверцетину в одній таблетці на величину межі розчинності кверцетину.

Використовуючи метод зовнішнього стандарту була визначена концентрація кверцетину в 1 таблетці препарату. Ця концентрація кверцетину склала 9,87 мг.

Межа розчинності кверцетину була попередньо знайдена за допомогою методики розробленої нами раніше й описана в РОЗДІЛІ ІІІ[106-107]. Ця величина склала 3,1 мкг/мл. Таким чином, для визначення вивільнення кверцетину в кожному із середовищ необхідно 4 л розчинника для 4 змін розчинника у склянках для розчинення.

У якості стандартного зразку нами була використана субстанція кверцетину, оскільки невизначеність аналізу не перевищує 3%.

## 5.6 Результати дослідження профілів розчинення для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте»

Після проведення досліджень профілів розчинення, отримали наступні дані для препарат «Синупрет екстракт», таблетки, вкриті оболонкою у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8 (табл.5.17, 5.19, 5.20)

Ступінь вивільнення кверцетину в розчин розраховували як частку кверцетину, що перейшов у розчин, до початкової наважки, взятої для проведення дослідження та вимірювали у відносних одиницях.



Таблиця 5.17

## Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 1,2

	«Синупрет-форте» таблетки №20	«Синупрет екстракт» таблетки №20
Час, хв	Серія 0000103801	Серія 0000106315
	% розчинення	% розчинення
10 хв	96.62 RSD<2%	91.04 RSD<2%
15 хв	100.11 RSD<2%	94.28 RSD<2%
20 хв	101.50 RSD<2%	94.45 RSD<2%
30 хв	102.30 RSD<2%	99.32 RSD<2%

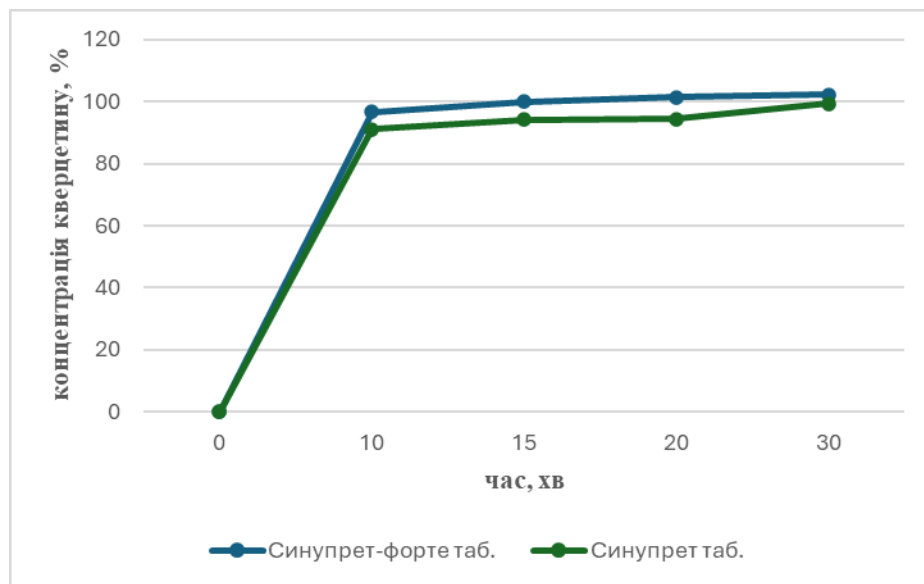


Рис. 5.7 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» за рН 1,2

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (5.1, табл.5.18):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n ( R_{(t)} - T_{(t)} )^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (5.1)$$

де:  $n$  — кількість точок контролю;

$R(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 5.18

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» для рН 1,2**

$f_2$	$1/n$	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
64,73 > 50	0.2	5,58	31,13	123,71
		5,83	33,98	
		7,05	49,70	
		2,98	8,88	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського засобу «Синупрет екстракт» таблетки №20, виробництва «Bionorica SE», подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Синупрет-форте» таблетки, №20, виробництва «Bionorica SE», за рН 1,2, відповідно до розрахованого фактору подібності (таб. 5.18).

Таблиця 5.19

## Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 4,5

Час, хв	«Синупрет-форте» таблетки №20 Серія 0000103801	«Синупрет екстракт» таблетки №20 Серія 0000106315
	% розчинення	% розчинення
10 хв	92.15 RSD<2%	71.77 RSD<2%
15 хв	92.41 RSD<2%	84.70 RSD<2%
20 хв	97.73 RSD<2%	83.16 RSD<2%
30 хв	102.30 RSD<2%	79.92 RSD<2%

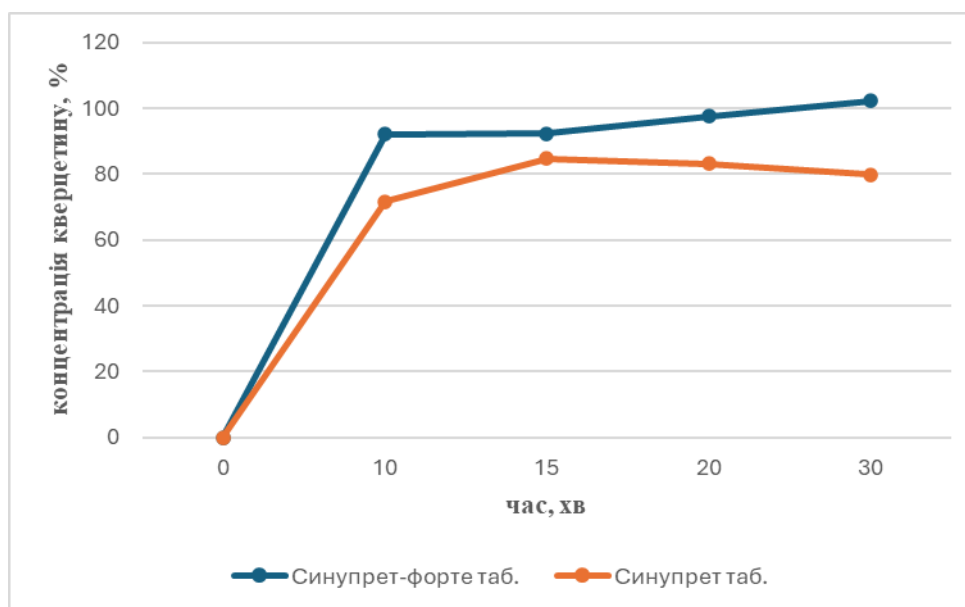


Рис. 5.8 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте», за рН 4,5

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (5.2, табл. 5.20):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_{(t)} - T_{(t)})^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (5.2)$$

де: n — кількість точок контролю;

R(t) - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

T( t ) - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 5.20

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» для рН 4,5**

$f_2$	1/n	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
40,56 < 50	0.2	20,38	415,34	1187,93
		7,71	59,44	
		14,57	212,28	
		22,38	500,86	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського засобу «Синупрет екстракт» таблетки №20, виробництва «Bionorica SE», не подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Синупрет-форте» таблетки, №20, виробництва «Bionorica SE», за рН 4,5, відповідно до розрахованного фактору подібності (таб. 5.20).

Таблиця 5.21

## Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 6,8

	«Синупрет-форте» таблетки №20	«Синупрет екстракт» таблетки №20
Час, хв	Серія 0000103801	Серія
	% розчинення	% розчинення
10 хв	88.74 RSD<2%	33.70 RSD<2%
15 хв	98.43 RSD<2%	57.11 RSD<2%
20 хв	101.02 RSD<2%	54.80 RSD<2%
30 хв	102.30 RSD<2%	88.40 RSD<2%

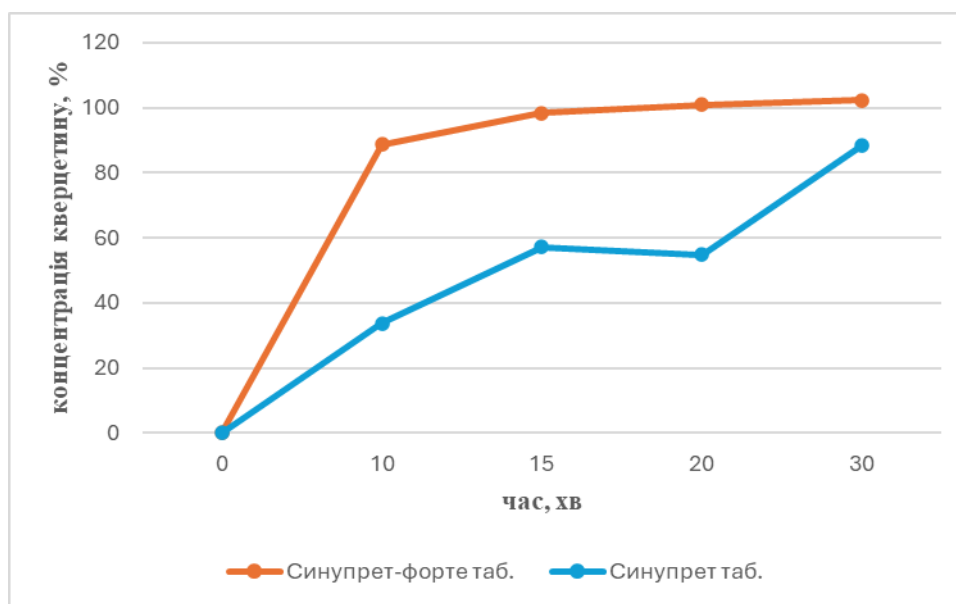


Рис.5.9 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте», за рН 6,8

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (5.3, табл. 5.22):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_{(t)} - T_{(t)})^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (5.3)$$

де: n — кількість точок контролю;

$R(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 5.22

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» для рН 6,8**

$f_2$	1/n	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
21,24<50	0.2	55,04	3029,40	7066,24
		41,32	1707,34	
		46,22	2136,28	
		13,9	193,21	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського засобу «Синупрет екстракт» таблетки №20, виробництва «Bionorica SE», не подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Синупрет-форте» таблетки, №20, виробництва «Bionorica SE», за рН 6,8, відповідно до розрахованого фактору подібності (таб. 5.22).

Отримані графічні залежності (рис. 5.7-5.9) дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біокейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%. Вміст кверцетину дорівнює 85% та досягається для всіх вивчених середовищ за 30 хв., що добре корелює з даними отриманими в попередніх дослідженнях для субстанції кверцетину [106-107], де також вміст досягався за 30 хв. При цьому контролювали значення відносного стандартного відхилення для усіх вимірних значень відгуків, отриманих для розчинів порівняння. Ця величина не повинна була перевищувати поріг встановлений фармакопеею для вимірів

виконуваних з невизначеністю не більше 3%. Для оцінки вірогідності отриманих результатів необхідно прийняти рівень значущості  $P \leq 0,05$ .

## Висновки до розділу 5

1. З використанням розробленої методики вивчення кінетики вивільнення кверцетину, доведено подібність оригінальних препаратів з різними складами «Синупрет-екстракт» та «Синупрет-форте». Дослідження було проведено згідно до вимог Настанови з процедури проведення біокейверу.

2. Коректність розробленої раніше методики визначення кверцетину для препаратів «Синупрет-екстракт» та «Синупрет-форте» доведено валідаційними дослідженнями

3. Експериментальними дослідженнями встановлено відсутність впливу компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища в тесті «Розчинення», відхилення рН в умовах методики не перевищувало 0,05.

4. Отримані профілі розчинення для препаратів «Синупрет екстракт» та «Синупрет-форте» при 3-х рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8.

5. Порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору  $f_2$  показали, що при рН 1,2, що моделює рН шлунку, профілі розчинення лікарських засобів «Синупрет» та Синупрет-форте» є подібними ( $f_2 = 64,73 > 50$ ), в той час як при більших значеннях рН – 4,5 та 6,8 – не є подібними ( $f_2 = 40,56$  та  $21,24$  відповідно).

6. Отримані графічні залежності дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біокейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%. Вміст кверцетину дорівнює 85% та досягається для всіх вивчених середовищ за 30 хв.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of flavonoids in herbal preparations. XI International scientific and practical conference 'Implementation of modern scientific opinions in practice'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 20-21 березня 2023 р., м. Більбао, Іспанія, European conference, 2023.
2. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of rutin in herbal preparations. XI International scientific and practical conference 'Problems of the development of science and the view of society'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 21-24 березня 2023 р., м. Грац, Австрія, International Science Group, , 2023.
3. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of caffeic acid in herbal preparations. International scientific and practical conference 'Modern chemistry of medicines'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 18 травня 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, 2023.



**РОЗДІЛ VI**  
**ВИВЧЕННЯ БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ДЕТРАЛЕКС ТА**  
**ПРЕПАРАТУ Д ЗГІДНО З УМОВАМИ НАСТАНОВИ З БІОВЕЙВЕРУ ТА**  
**ВИКОРИСТАННЯ НОВОГО ПІДХОДУ ДО ВИВЧЕННЯ ВИВІЛЬНЕННЯ**  
**КВЕРЦЕТИНУ**

Оригінальний препарат «Детралекс» (Detralex<sup>®</sup>) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires Servier, Франція) (табл. 6.1), був використаний як об'єкт дослідження із використанням розробленого методу для проведення дослідження відтворюваності від серії до серії препарату (досліджуваного і референтного), що використовується як основа при виборі прийнятних серій для дослідження *in vivo*. Цей розділ також містить опис порівняльних досліджень розчинення, що були проведені для оригінального лікарського засобу «Детралекс» (Detralex<sup>®</sup>) таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires Servier, Франція) та генеричного препарату вітчизняного виробництва, таблетки вкриті плівковою оболонкою, по 1000 мг, Україна, у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8, порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору  $f_2$ .

Таблиця 6.1

## Склад препарату «Детралекс» та «Препарату Д»

Назва компоненту	Вміст компоненту
«Детралекс», таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 1000 мг	
<p><i>Діючі речовини:</i> 1 таблетка містить: очищена, мікронізована флавоноїдна фракція, у перерахунку на суху речовину, 1000,00 мг, що складається з: діосміну, флавоноїди у перерахунку на гесперидин</p> <p><i>Допоміжні речовини:</i> вода очищена 40,00 мг, желатин 62,00 мг, стеарат магнію 8,00 мг, целюлоза мікрокристалічна 124,00 мг, карбоксиметилкрохмаль натрію тип А 54,00 мг, тальк 12,00 мг;</p> <p><i>Оболонка плівкова:</i> натрію лаурил сульфат 0,130 мг, премікс для плівкової оболонки оранжево-рожевого кольору ОУ-S-8761, що складається з: гліцерол 1,628 мг, гіпромеллоза 27,039 мг, макрогол 6000 0,651 мг, 1 крас 2, титану діоксид 5,205 мг, барвник заліза оксид жовтий 0,633 мг;</p> <p><i>Допоміжна речовина для полірування таблеток:</i> макрогол 6000 1300 мг.</p>	<p>900,0 мг (90%) 100,0 мг (10%)</p> <p><i>Враховуючи середню вологість очищеної, мікронізованої флавоноїдної фракції – 4% (або 40 мг на таблетку), кількість субстанції на одну таблетку – 1040,00 мг.</i></p>
«Препарат Д» таблетки, вкриті плівковою оболонкою, 1000 мг	
<p><i>Діючі речовини:</i> 1 таблетка містить очищеної мікронізованої флавоноїдної фракції яка містить діосміну гесперидину*</p> <p>* — під назвою «гесперидин» мають на увазі суміш флавоноїдів</p> <p><i>Допоміжні речовини:</i> целюлоза мікрокристалічна; натрію крохмальгліколят (тип А); гіпромеллоза; тальк; натрію лаурилсульфат; магнію стеарат; суміш для покриття «Opaglos 2 Orange» № 97A23967 містить: натрію карбоксиметилцелюлозу, мальтодекстрин,</p>	<p>1000,0 мг 900,0 мг (90%) 100,0 мг (10%)</p>

декстрази моногідрат, титану діоксид (Е 171), кислоти стеаринову очищену, тальк, заліза оксид жовтий (Е 172), заліза оксид червоний (Е 172), жовтий захід FCF (Е 110).	
--	--

Із наведених у таблиці 6.1 про склад препаратів «Детралекс» та «Препарату Д», можна зробити висновок, що склад як діючих речовин, що зумовлюють фармакотерапевтичний ефект, так і склад допоміжних речовин є схожим і відповідає вимогам настанови з проведення процедури біовейверу, яка була використана у даному дослідженні у повному форматі [1].

Слід зазначити, що для стандартизації/квантифікації обох препаратів обрані фармакологічні маркери – речовини флавоноїдної природи діосмін та гесперидин. Однак, одним з компонентів суми флавоноідів, є кверцетин, тому його вклад у дію суми БАР є безсумнівним.

#### 6.1 Методика кількісного визначення кверцетину методом ВЕРХ-МС

Для проведення досліджень і вимірювань використовували аналітичну методику, що була розроблена для визначення кверцетину та наведена у Розділі 4.

За обраних нами умов були одержані хроматограми повного іонного струму для зразків в трьох середовищах, із значеннями рН 1.2, 4.5 та 6.8 які планувалося використовуватися для проведення тесту «Розчинення» (рис.6.1-6.4).

У якості стандартного зразку нами була використана субстанція кверцетину, оскільки невизначеність аналізу не перевищує 3%.

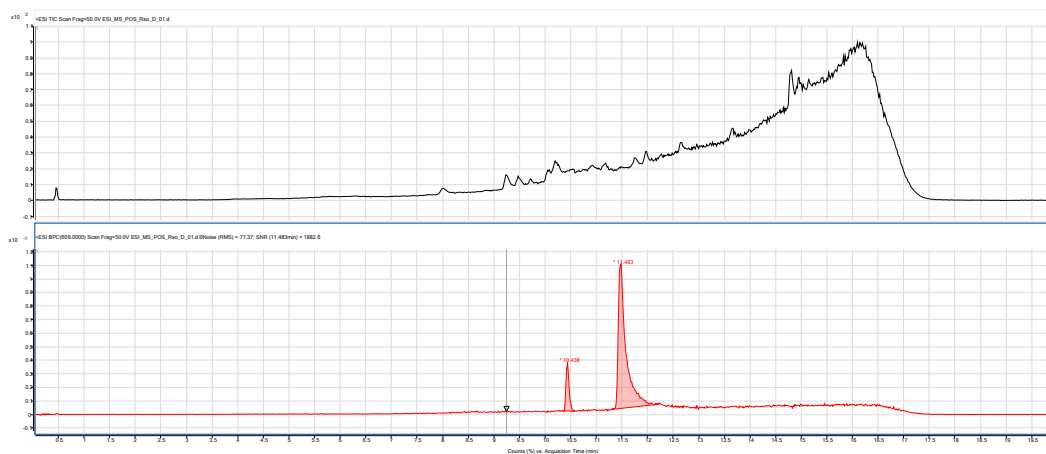


Рис. 6.1 Хроматограма повного іонного струму розчину порівняння

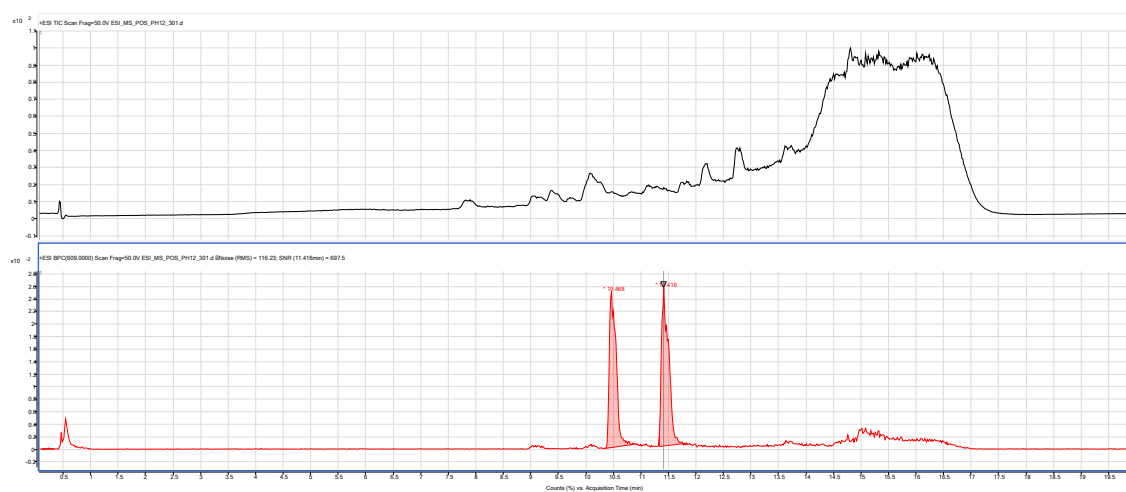


Рис. 6.2 Хроматограма повного іонного струму випробовуваного розчину рН

1.2.

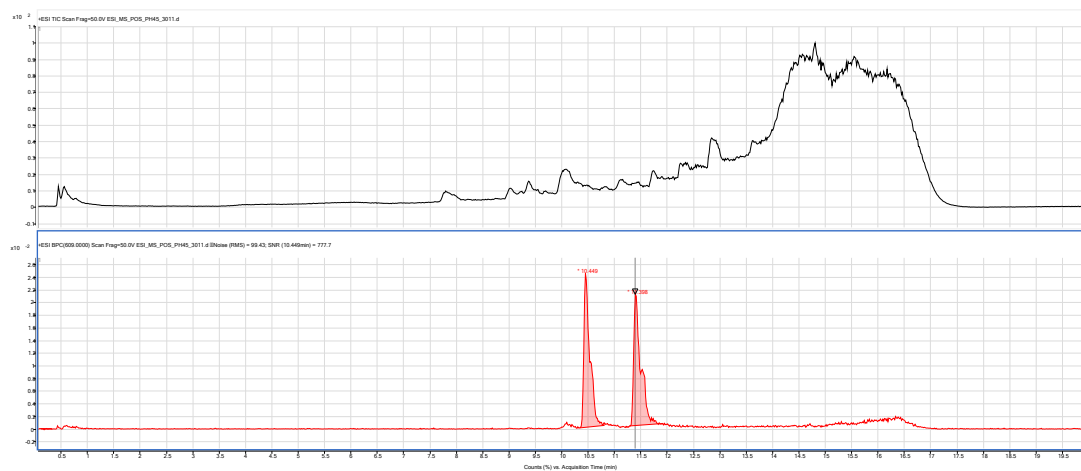


Рис. 6.3 Хроматограма повного іонного струму випробовуваного розчину рН

4.5.

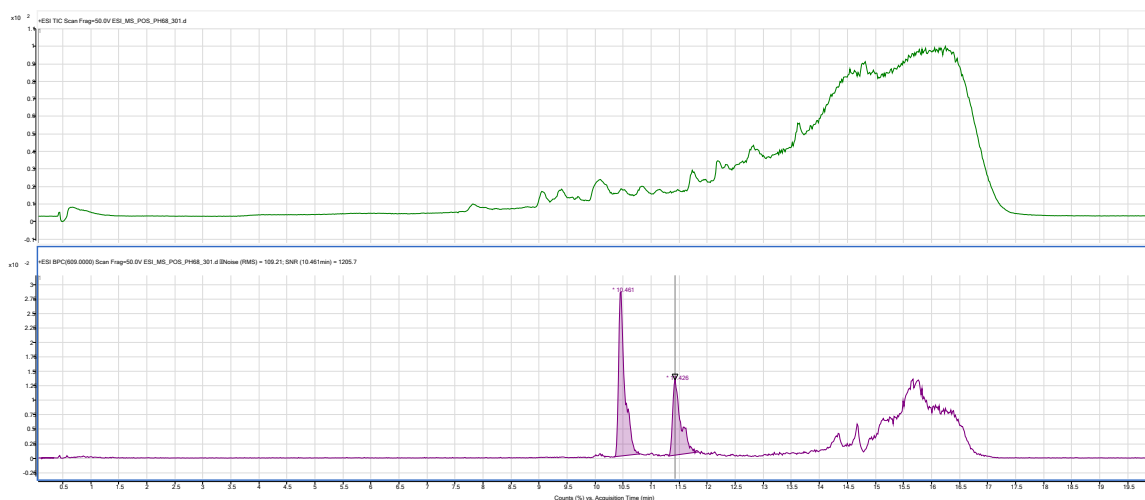


Рис. 6.4 Хроматограма повного іонного струму випробовуваного розчину рН 6.8.

## 6.2 Валідація розробленої методики

Для того, щоб використовувати цю методику при проведенні випробувань по визначенню розчинності кверцетина, згідно зі схемою біовейвера для трьох середовищ розчинення з рН 1.2, 4.5 та 6.8, була проведена валідація методики як методу кількісного визначення зі значенням максимальної невизначеності 1,6%. Валідація методики проводилась за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, прецизійність правильність та внутрішньолабораторна прецизійність [4].

Оскільки використовуваний в методиці метод ВЕРХ-МС є специфічним, для доказу того, що методика є специфічною достатньо щоб виконувались усі вимоги до критеріїв лінійності, правильності, прецизійності та внутрішньо лабораторної прецизійності.

Модельні розчини для хроматографування готували за аналітичною методикою наведеною раніше. Методика приготування стандартного розчину. Холостий розчин готували аналогічно досліджуваному розчину препарату.

*Лінійність.* Оцінку лінійності проводили в діапазоні (80-120%) застосування методики за стандартною методикою. Дослідження характеру залежності сигналу від концентрації проводили з використанням 9 модельних розчинів для аналізу з точними концентраційними вагами: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120%. У той же час концентрація, прийнята за 100%, була концентрацією кверцетину, яка знаходиться в середині діапазону, що охоплює мінімальну та максимальну концентрації кверцетину [4].

Вимоги до параметрів лінійності розраховані згідно вимог ДФУ [4] до тесту «Розчинення» (табл. 6.2-6.5).

Таблиця 6.2

**Вимоги до параметрів лінійності**

№ розчину	С розчину, %
1	80
2	90
3	100
4	115
5	120

$RSD_y$ : 14,58%

Вимоги до невизначеності результатів аналізу: 3%

Вимоги до  $RSD_0/b$ : 1,27%

Student (95, 1, 4) = 2,3534

Вимоги до  $r$ : 0,99617

Вимоги до  $a$ : 6,4%

Таблиця 6.3

## Середні значення досліджуваних концентрацій

№	Назва зразка	S	Статус	Концентрація
1	2	3	4	5
1	Reference	3616006	RS	1,00E+00
2	Reference	3616007	RS	1,00E+00
1	2	3	4	5
3	85	1935221	test	8,50E-01
4	85	1935228	test	8,50E-01
5	95	3150631	test	9,50E-01
6	95	3150637	test	9,50E-01
7	110	4958315	test	1,10E+00
8	110	4958311	test	1,10E+00
9	115	5663855	test	1,15E+00
10	115	5663850	test	1,15E+00
11	120	6311895	test	1,20E+00
12	120	6311890	test	1,20E+00

Таблиця 6.4

## Значення дисперсій

Випробовувані розчини	Назва	Середнє S <sub>i</sub>	C <sub>i</sub>	RSD <sub>i</sub> ,%
1	85	1935224,5	0,85	0,0002558
2	95	3150634	0,95	0,00013466
3	110	4958313	1,1	5,704E-5
4	115	5663852,5	1,15	6,242E-5
5	120	6311892,5	1,2	5,601E-5

Рівноточність RSD<sub>j</sub> за модифікованим критерієм Бартлетта:

Процентна точка *m* (таблична): 11,07

Критерій Бартлетта: 6,72

Висновок: дисперсії відрізняються незначуще, вибірки рівноточні.

Student (95, 1, 6) = 1,9432

Вимоги щодо максимально припустимого RSD<sub>р</sub>: 1,54%

Розраховане значення об'єднаного стандартного відхилення  $RSD_r$ : 0,00%

Висновок: Вимоги до збіжності вимірювань витримуються.

Таблиця 6.5

Таблиця для середніх значень

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$RSD_i, \%$
1	85	1935224,50	0,85	0,00
2	95	3150634,00	0,95	0,00
3	110	4958313,00	1,1	0,00
4	115	5663852,50	1,15	0,00
5	120	6311892,50	1,2	0,00

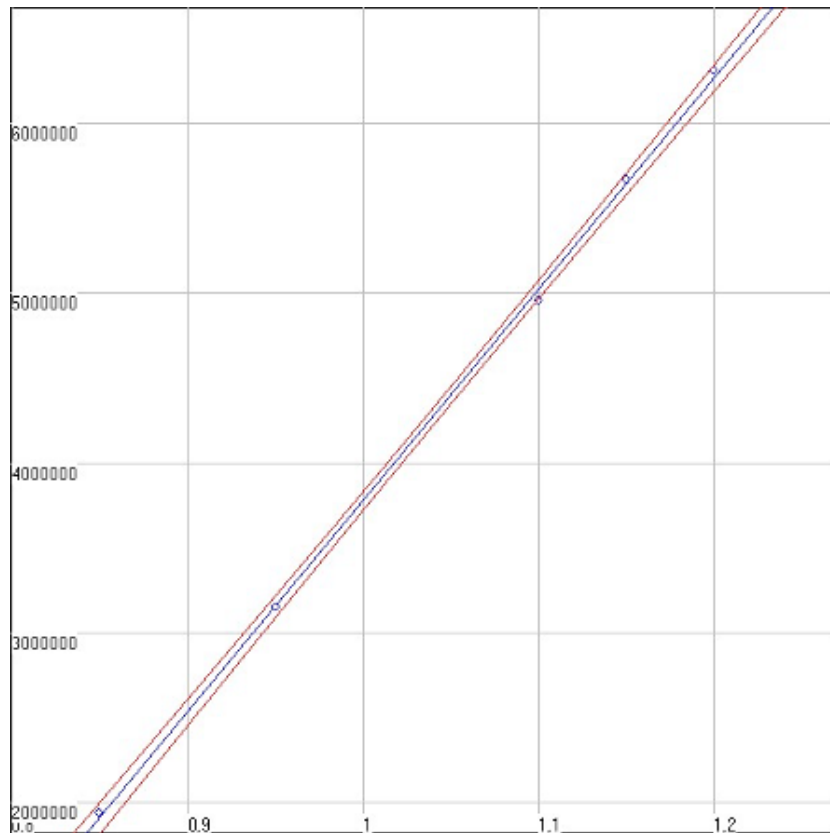


Рис. 6.5 Графік залежності середніх значень  $S_i = a + b \times C_i$

Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ [4]. Побудова калібрувального графіка здійснювалась у нормованих координатах (рис. 6.5). Для кожного з дев'яти зразків



розчинів розраховували середні значення площі піку ( $S_i$ ). Отримані результати оброблено методом найменших квадратів для прямої  $Y = b \cdot x + a$  (рис. 6.5). Розраховані статистичні значення  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (кінцеве стандартне відхилення) і  $r$  (коефіцієнт кореляції) наведені в таблиці 6.5.

У нашому випадку вимоги до параметрів лінійної регресії виконуються у всьому діапазоні застосування методики (80 - 120%) (таб. 6.6-6.9).

Таблиця 6.6

### Параметри лінійності і критерії (для середніх значень)

Параметри	Значення
$b$	12458547,0000
$s_b$	165871
$a$	-8,7E6
$s_a$	175502
$s_0$	48359
$s_0 / b$	0,0039
$s_Y$	1816612,50
$r$	0,99973

Таблиця 6.7

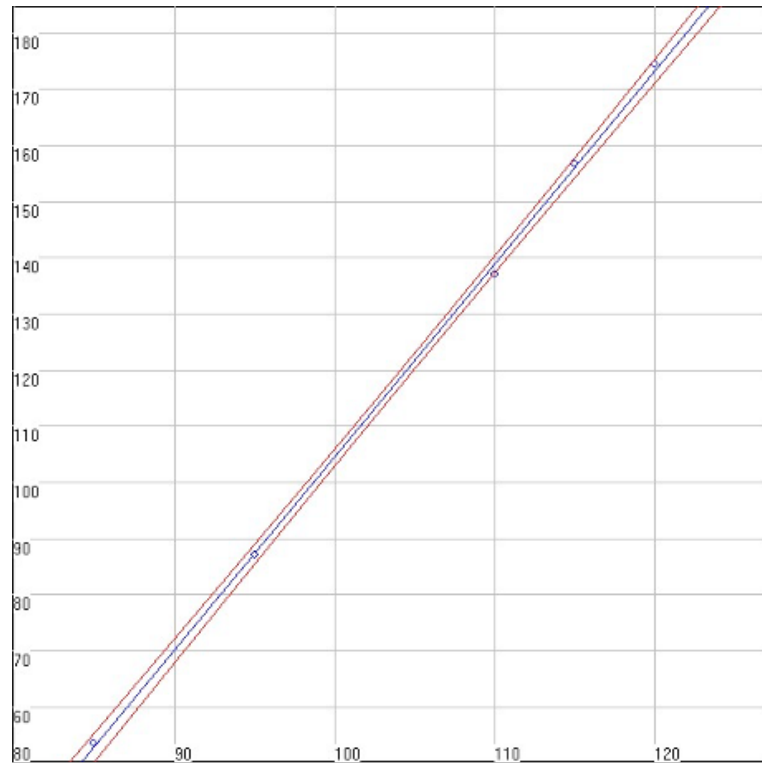
### Таблиця приведених значень для розчину порівняння

Розчин порівняння	Середнє $S_{st}$	$C_{st}$	$RSD_{st}, \%$
Reference	3616006,5	1	2E-5

Таблиця 6.8

Таблиця для приведених значень для випробовуваних розчинів

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$Y_i$	$X_i$	RSD <sub>i</sub> , %	$Z_i$ , %
1	85	1935224,50	0,85	53,52	85,00	0,00	62,96
2	95	3150634,00	0,95	87,13	95,00	0,00	91,72
3	110	4958313,00	1,1	137,12	110,00	0,00	124,66
4	115	5663852,50	1,15	156,63	115,00	0,00	136,20
5	120	6311892,50	1,2	174,55	120,00	0,00	145,46

Рис.6.6 Графік залежності приведених значень  $Y_i = a + b \times X_i$ :

Таблиця 6.9

**Параметри лінійності і критерії (для приведених значень)**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	3,4454	-	-	-
s <sub>b</sub>	0,045871	-	-	-
a	-2,4E2	≤   11,4	≤   6,4	витримуються за першим критерієм
s <sub>a</sub>	4,8535	-	-	-
s <sub>0</sub>	1,33737	-	-	-
s <sub>0</sub> /b	0,39	≤   1,27	-	витримуються
s <sub>y</sub>	14,58		-	-
r	0,996	≥   0,99617	-	витримуються

$$\text{Student (95, 1, 3) = 2,3534}$$

*Висновок:* Вимоги до *r* витримуються.

*Правильність.* Для оцінки правильності та збіжності методик розраховували співвідношення знайдено/введено для вказаних модельних зразків. Виходячи із значення величини довірчого інтервалу одиничного значення співвідношення знайдено/введено, робили висновок про збіжність результатів аналізу. Прецизійність підтверджували незначущою систематичною похибкою. Для цього розраховували критерій Стьюдента (Таб. 6.9 -6.12).

Таблиця 6.10

**Таблиця для приведених значень**

Випробовувані розчини	Назва	Середнє S:	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub>	Z <sub>i</sub> ,%
1	85	1935224,5	53,52	85,00	62,96
2	95	3150634	87,13	95,00	91,72
3	110	4958313	137,12	110,00	124,66
4	115	5663852,5	156,63	115,00	136,20
5	120	6311892,5	174,55	120,00	145,46

Таблиця 6.11

**Параметри правильності**

	Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
Правильність	$ Z_{cp} - 100 $	$ 12,2 $	$\leq 33$	$\leq 0,96$	витримуються за першим критерієм

$$S_z (\%) = 34,211$$

$$\text{Student} (95, 1, 4) = 2,13180$$

*Висновок:* Вимоги до правильності витримуються за першим критерієм

Таблиця 6.12

**Параметри межі виявлення**

Межа виявлення, %	Межа кількісного визначення, %
МВ = 4,6	МКВ = 14,1

*Висновок:* Параметри придатності, що наведені у методиці, є достатніми та дозволяють коректно та стабільно отримувати достовірні результати кількісного визначення в розчинах.

Для оцінки внутрішньої лабораторної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту речовин, що має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу:  $\Delta z \leq 1,6 \%$ . Випробування проводять із використанням однієї серії препарату різними аналітиками на одному хроматографі у різні дні із використанням різного мірного посуду

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджено тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ( $\Delta z = 0,97 \% \leq 1,6 \%$ ).

### 6.3 Методика вивчення вивільнення кверцетину згідно до вимог тесту «Розчинення» ДФУ

Розчинення таблеток *in vitro* досліджували в діапазоні рН 1 - 6.8 (рН 1.2, 4.5 та 6.8). Додаткові дослідження які можуть бути необхідними при значеннях рН, в яких діюча речовина має мінімальну розчинність не проводилися. Будь-які поверхнево активні речовини при проведенні експерименту не використовувалися.

Використовували 6 одиниць лікарського засобу для кожного дослідження для проведення статистичної оцінки.

Кількість досліджуваних зразків для проведення зазначених досліджень складала: 6 зразків, всього 1 серія. Кількість вимірювань складала: 144 визначень концентрацій для двох аліквот кожного з трьох середовищ та 4 часових точок відбору. Звичайними умовами дослідження є:

Об'єм середовища	1000 мл
Швидкість обертання лопаті	100 об/хв
Температура:	37±0,5 °С
Середовище розчинення	Буферний розчин рН 1,2
	Буферний розчин рН 4,5
	Буферний розчин рН 6,8
Графік відбору проб:	5, 10, 15, 30 хв;
Відбір проб проводився:	Із компенсацією об'єму середовища розчинення

**Методика:** 2 таблетки препарату «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція, поміщали у дві емності системи для тестування розчинення «Pharma Test» тип РТ-DT70, додавали 1000 мл відповідного буфера і проводили тест «Розчинення» за наведеними умовами. При досягненні часу відбору проби, виконували заміну 900 мл відповідного буфера, використовуючи для подальшого кількісного визначення

аліквоту відібраних 900 мл проби. Відбір проб проводили із центру ємності. Об'єм 900,0 мл, що відбирається, було встановлене експериментально так, щоб забезпечувати нижчу похибку при відборі проби.

Аліквоту центрифугували протягом 10 хвилин при 10000 об/хв. 1,0 мл верхнього шару обережно відбирали після центрифугування, уникаючи попадання на агломерати нижнього шару, та переносили у віали для хроматографії.

#### 6.4 Вплив рН на проведення тесту «Розчинення»

Перед проведенням дослідження профілів розчинення були проведені дослідження зміни рН тих середовищ розчинення які планувалося використовувати для проведення тесту «Розчинення» для препарату «Детралекс». Дослідження проводили для рН трьох буферних розчинів в вищенаведених умовах для проведення тесту «Розчинення».

Вплив компонентів досліджуваних препаратів на рН середовища розчинення наведений нижче в таблицях 6.12-6.14:

*Таблиця 6.13*

#### **Вплив «Детралекс» таблетки, на середовище з рН 1.2**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	1,240	1,236
2		1,237
3		1,237
4		1,236
1		3
5		1,235
6		1,236
7		1,236
8		1,234
9		1,235
10		1,240
11		1,235
12	1,243	

Таблиця 6.14

**Вплив «Детралекс» таблетки, на середовище з рН 4.5**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	4,520	4,532
2		4,520
3		4,519
4		4,517
5		4,520
6		4,519
7		4,520
8		4,524
9		4,520
10		4,515
11		4,520
12		4,517

Таблиця 6.15

**Вплив «Детралекс» таблетки, на середовище з рН 6.8**

№ зразку	рН до розчинення	рН після розчинення
1	6,804	6,320
2		6,284
3		6,229
4		6,255
5		6,234
6		6,281
7		6,283
8		6,363
1		3
9		6,359
10		6,340
11		6,359
12	6,340	

**Висновок:** Препарат «Детралекс» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг є рН незалежним для всіх досліджених значень рН. Оскільки досліджуваний препарат не завдає помітного впливу на рН середовища розчинення (відхилення

значення рН складо менше 0,05) був зроблений позитивний висновок про можливість використання цих середовищ розчинення для проведення тесту «Розчинення».

#### 6.5 Результати дослідження профілів розчинення для препаратів «Детралекс» та «Препарат Д»

Після проведення досліджень профілів розчинення, отримали наступні дані для препарат «Детралекс» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8 (табл.6.16, 6.18, 6.20)

Ступінь вивільнення кверцетину в розчин розраховували як частку кверцетину, що перейшов у розчин, до початкової наважки, взятої для проведення дослідження та вимірювали у відносних одиницях.

Таблиця 6.16

#### Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 1,2

	«Детралекс» (Detralex®) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція	«Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна
Час, хв	Серія 620747 % розчинення	Серія 162328 % розчинення
10 хв	91,04 RSD<2%	74,13 RSD<2%
15 хв	94,28 RSD<2%	71,76 RSD<2%
20 хв	94,45 RSD<2%	75,20 RSD<2%
30 хв	99,32 RSD<2%	94,77 RSD<2%



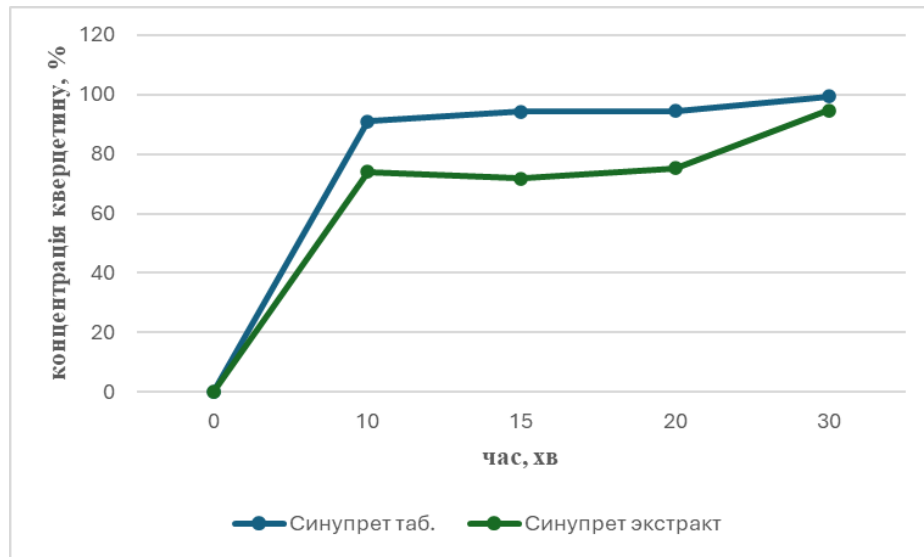


Рис. 6.7 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів Детралекс та Препарат Д, за рН 1,2

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (6.1, табл.6.17):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n ( R_{(t)} - T_{(t)} )^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (6.1)$$

де: n — кількість точок контролю;

$R(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 6.17

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Детралекс» та  
«Препарат Д» за рН 1,2**

$f_2$	1/n	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
40,59 < 50	0.2	16,91	285,94	1184,36
		22,52	507,15	
		19,25	370,56	
		4,55	20,70	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського засобу «Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна, Серія 162328, не подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Детралекс» (Detralex<sup>®</sup>) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція Серія 620747, за рН 1,2, відповідно до розрахованого фактору подібності (таб. 6.17).

Таблиця 6.18

**Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 4,5**

	«Детралекс» (Detralex <sup>®</sup> ) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція	«Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна
Час, хв	Серія 620747 % розчинення	Серія 162328 % розчинення
10 хв	71,77 RSD < 2%	59,01 RSD < 2%
15 хв	84,70 RSD < 2%	72,90 RSD < 2%
20 хв	83,16 RSD < 2%	81,73 RSD < 2%
30 хв	79,92 RSD < 2%	83,41 RSD < 2%

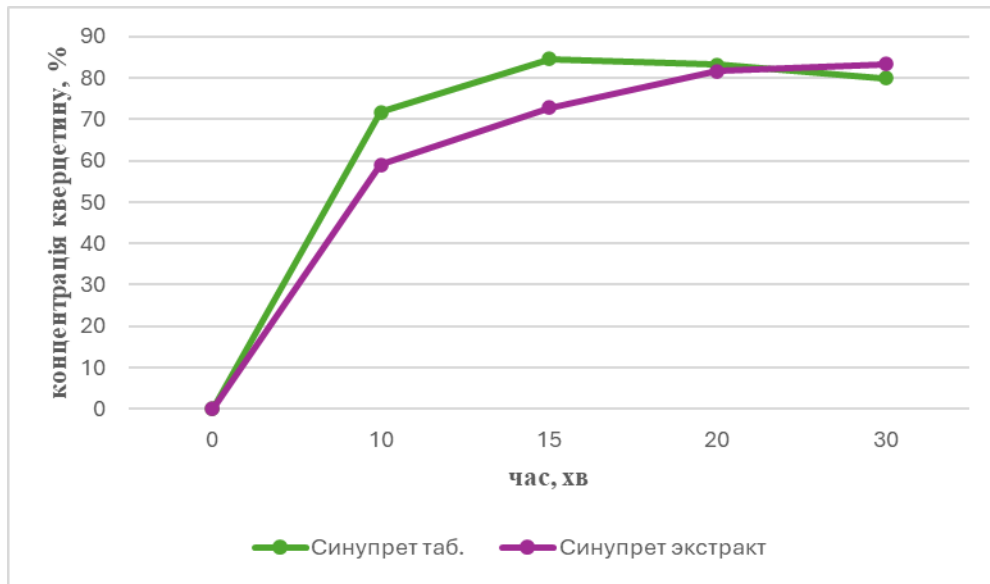


Рис. 6.8 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів «Детралекс» та «Препарат Д», за рН 4,5

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (6.2, табл.6.19):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n ( R_{(t)} - T_{(t)} )^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (6.2)$$

де: n — кількість точок контролю;

$R(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 6.19

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Детралекс» та  
«Препарат Д» за рН 4,5**

$f^2$	1/n	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
54,80 > 50	0.2	12,76	162,81	316,28
		11,8	139,24	
		1,43	2,04	
		-3,49	12,18	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського «Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна, Серія 162328, подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Детралекс» (Detralex®) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція Серія 620747, за рН 4,5, відповідно до розрахованого фактору подібності (таб. 6.19).

Таблиця 6.20

**Концентрації кверцетину отримані для середовища розчинення з рН 6,8**

	«Детралекс» (Detralex®) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція	«Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна
	Серія 620747	Серія 162328
Час, хв	% розчинення	% розчинення
10 хв	33,70 RSD<2%	76,34 RSD<2%
15 хв	57,11 RSD<2%	72,70 RSD<2%
20 хв	54,80 RSD<2%	101,63 RSD<2%
30 хв	88,40 RSD<2%	91,48 RSD<2%

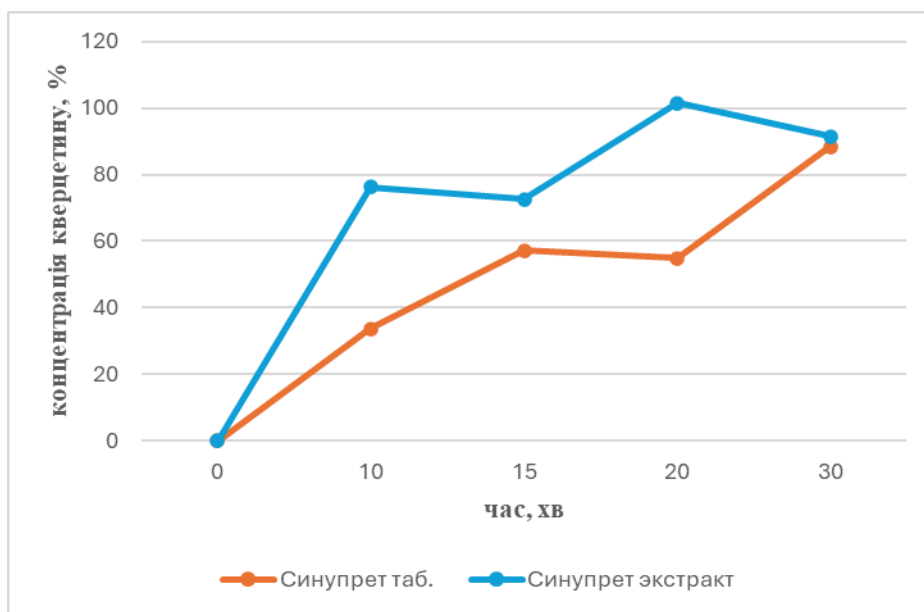


Рис. 6.9 Профіль вивільнення кверцетину для препаратів «Детралекс» та «Препарат Д», за рН 6,8

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів був розрахований фактор подібності ( $f_2$ ) (6.3, табл. 6.21):

$$f_2 = 50 * \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n ( R_{(t)} - T_{(t)} )^2 ]^{-0,5} * 100 \}, \quad (6.3)$$

де: n — кількість точок контролю;

$R(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$  - середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Таблиця 6.21

**Розрахунок фактору подібності для препаратів «Детралекс» та  
«Препарат Д» за рН 6,8**

$f^2$	$1/n$	$R_t - T_t$	$(R_t - T_t)^2$	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$
26,71 < 50	0.2	-42,64	1818,17	4263,75
		-15,59	243,04	
		-46,83	2193,04	
		-3,08	9,48	

*Висновок* Профілі розчинення лікарського засобу «Препарат Д» таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, Україна, Серія 162328, не подібні профілю розчинення таблеток референтного лікарського засобу «Детралекс» (Detralex®) таблетки, вкриті оболонкою, по 1000 мг, «Серв'є» (Les Laboratoires servier), Франція Серія 620747 при рН 6,8, відповідно до розрахованого фактору подібності (таб. 6.21).

Отримані графічні залежності (рис. 6.7-6.9) дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біокейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%. Вміст кверцетину дорівнює 85% та досягається для всіх вивчених середовищ за 30 хв., що добре корелює з даними отриманими в попередніх дослідженнях для субстанції кверцетину [106-107] де також вміст досягався за 30 хвилин. При цьому контролювали значення відносного стандартного відхилення для усіх виміряних значень відгуків, отриманих для розчинів порівняння. Ця величина не повинна була перевищувати поріг встановлений фармакопеею для вимірів виконуваних з невизначеністю не більше 3%. Для оцінки вірогідності отриманих результатів необхідно прийняти рівень значущості  $P \leq 0,05$ .

## Висновки до розділу 6

1. Використовуючи розроблений підхід до вивчення розчинності кверцетину у водних розчинах, був проведений біолейвер для генеричного препарату «Препарат Д» та референтного препарату «Детралекс».

2. Валідаційними дослідженнями доведено можливість використання розробленої методики ВЕРХ/МС для проведення біолейверу оригінального препарату «Детралекс» та його генеричного аналога, згідно з умовами Настанови з біолейверу.

3. Встановлено відсутність впливу допоміжних речовин на рН середовища при проведенні тесту «Розчинення» для досліджуваних препаратів (відхилення значення рН склало менше 0,05)

4. Для оцінки еквівалентності досліджуваних препаратів отримані профілі розчинення для «Препарату Д» та «Детралексу» в умовах, описаних в Настанові з проведення біолейверу. Порівняння профілів та розрахунок фактору подібності  $f_2$  показали, що профілі розчинності препаратів є подібними при рН 4,5 ( $f_2 = 54,8$ ), в той час як при рН 1,2 та 6,8 – неподібними ( $f_2 = 40,59$  та  $26,71$  відповідно).

5. Отримані графічні залежності дозволяють зробити висновок про відповідність отриманих результатів вимогам БСК до результатів біолейвера, відносне стандартне відхилення першої точки не перевищує 20% і наступних не перевищує 10%.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Новий підхід вирішення проблеми біолейверу для речовин 3 та 4 класу БСК. International scientific and practical conference 'Безперевний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи'; матеріали Наук.-практ.

інтернет-конф. з міжнародною участю, 01 листопада 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, 2023. Стор. 299-301.

2. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Новий підхід вивчення вивільнення кверцетину у процесі фармакокінетичних досліджень. International scientific and practical conference ‘Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології’; матеріали III Міжнародна наук.-практ. інтернет-конф., 24 листопада 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, 2023.

3. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Розробка методики вибору речовини маркеру при аналізі комбінованих рослинних препаратів, що містять кверцетин. International scientific and practical conference ‘X Innovate scientific research: theory and practice’; матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, 21-24 листопада 2023 р., м. Стокгольм, Швеція, 2023.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення науково-практичної задачі визначення біодоступності важкорозчинних речовин на прикладі кверцетину. Автором запропоновано оригінальний підхід для проведення тесту «Розчинення», що відповідає вимогам ДФУ та апробовано його прийнятність для цілей фармацевтичної розробки, подібності та біоеквівалентності лікарських засобів відповідно до вимог Настанови з біоеквівалентності.

1. Теоретично обґрунтовано та сформульовано новий підхід до проведення тесту «Розчинення» та визначення біодоступності для важкорозчинних АФІ шляхом модифікації застосування описаного у ДФУ методу проточної комірки до стандартної установки з відкритими ємностями та попереднього точного визначення межі розчинності речовини у воді (за відсутності об'єктивних даних).
2. Розроблено та валідовано оригінальну методику визначення межі розчинності кверцетину методом ВЕРХ-МС у водному середовищі. Визначено залежність концентрації кверцетину, що переходить в розчин, від часу, та залежність концентрації від об'єму розчину. За результатами статистичної обробки даних та поліноміального аналізу кривих вивільнення встановлено значення межі розчинності кверцетину в водних середовищах (3,1 мкг/мл).
3. Запропоновано оригінальний альтернативний метод для кількісного визначення межі розчинності важкорозчинних речовин, на прикладі кверцетину, заснований на вимірюванні концентрації загального органічного вуглецю в кислих розчинах та подальшою апроксимацією даних для визначення значення при рН 7,0, що становить 0,7 мкг/мл. Порівняння

даних, отриманих за методикою ТОС та даних, отриманих з використанням хроматографічної методики, дозволяє передбачити, що метод визначення загального органічного вуглецю дозволяє отримати точніше значення межі розчинності кверцетину в нейтральному середовищі.

4. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення кверцетину в середовищах (рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8) для проведення тесту «Розчинення» методом ВЕРХ-МС.
5. Вперше отримано профілі розчинності кверцетину у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 ,рН 4,5 та рН 6,8, для препарату «Квертин» таблетки жувальні по 40 мг згідно до вимог БСК. Проведено кореляційний аналіз даних *in vitro/ in vivo* для препарату «Квертин» з використанням методології IVIVC. Отримані результати дозволяють стверджувати, що запропонований підхід до вивчення кінетики вивільнення важкорозчинних у водних розчинах речовин дозволяє коректно оцінювати вивільнення таких речовин згідно до вимог БСК.
6. З використанням розробленого підходу вивчення кінетики вивільнення кверцетину, було доведено подібність оригінальних препаратів з різними складами «Синупрет-екстракт» та «Синупрет-форте». Дослідження було проведено згідно до вимог Настанови з процедури проведення біофейверу. Було проведено валідацію розробленої методики. Були отримані профілі розчинення при 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8, порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору подібності.
7. З використанням розробленого підходу вивчення кінетики вивільнення кверцетину, було вивчено подібність між препаратом «Препарат Д» та референтним оригінальним препаратом «Детралекс». Дослідження було проведено згідно до вимог Настанови з процедури проведення біофейверу. Було проведено валідацію розробленої методики. Були отримані профілі

розчинення при 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2 , рН 4,5 та рН 6,8, порівняння профілів розчинення та розрахунок фактору подібності.

8. Експериментальними дослідженнями підтверджено можливість застосування запропонованого підходу для фармацевтичної розробки твердих лікарських форм, процедури біоверифікації для дослідження лікарських засобів подібного складу та дослідження біоеквівалентності генеричних ЛЗ.
9. Підходи до статистичної обробки даних для визначення межі розчинності використано при розробці монографій ДФУ 5.3.N.3 «Забезпечення якості», та 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту»

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Лікарські засоби. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності: Настанова з клінічних досліджень СТ-Н МОЗУ 42–7.4: 2022 / – Вид. Офіц. К: МОЗ України, 2022, 96 с.
2. Talevi A., Bellera C.L. Biopharmaceutics drug disposition classification system. The ADM Encyclopedia: a comprehensive guide on biopharmacy and pharmacokinetics. *Berlin: Springer*; 2022. p. 185-189.
3. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>
4. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
5. Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Pérez-Gálvez A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res.* 2009 №11. P. 751-760.
6. Polyphenols: food sources and bioavailability./ Manach C., et al. *Am J Clin Nutr.* 2004. № 79(5). P. 727-747.
7. Neilson A.P., Ferruzzi M.G. Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011. № 2. P.125-151.
8. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. / Richelle M., et al. *Br J Nutr.* 2006. № 96(2). P. 227-238.
9. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. / Niot I., et al. *Prog Lipid Res.* 2009. № 48(2). P. 101-15.

10. Del Rio D., Borges G., Crozier A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nutr.* 2010. № 104 Suppl 3:S67-90.
11. Viskupicova J., Ondrejovic M., Sturdík E. Bioavailability, and metabolism of flavonoids. *J Food Nutr Res.* 2008. № 47. P. 151–162.
12. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. / Lotito S.B., et al. *Free Radic Biol Med.* 2011. № 51(2). P. 454-463.
13. Spencer J.P.E., Abd El Mohsen M.M., Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys.* 2004. № 423. P. 148–161.
14. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl) acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl) - $\gamma$ - valerolactone as the major metabolites. / Appeldoorn M.M., et al. *J Agric Food Chem.* 2009. № 57(3). P. 1084-1092.
15. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. / Hollman P.C., et al. *FEBS Lett.* 1997. № 418(1-2). P. 152-156.
16. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. / Ottaviani J.I., et al. *Free Radic Biol Med.* 2011. № 50(2). P. 237-244.
17. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. / Muthyala R.S., et al. *Bioorg Med Chem.* 2004. №12(6). P. 1559-1567.
18. Stereoselective conjugation, transport and bioactivity of S- and R-hesperetin enantiomers in vitro. / Brand, W., et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010. № 58(10). P 6119-6125.

19. UPLC-MS/MS quantification of total hesperetin and hesperetin enantiomers in biological matrices. / Lévèques A., et al. *J Pharm Biomed Anal.* 2012. № 57. P. 1-6.
20. The proportion of lycopene isomers in human plasma is modulated by lycopene isomer profile in the meal but not by lycopene preparation. / Richelle M., et al. *Br J Nutr.* 2012. № 107(10). P. 1482-1488.
21. Lycopene bioavailability and metabolism in humans: an accelerator mass spectrometry study. / Ross A.B., et al. *Am J Clin Nutr.* 2011. № 93(6). P. 1263-1273.
22. Kasikci M.B., Bagdatlioglu N. Bioavailability of quercetin. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 2016. Vol. 4, no. 2. P 146-151.
23. Agrawal A.D. Pharmacological activities of flavonoids: Review. *Int. J. Pharm. Nanotechnol.* 2011. № 4. P. 1394–1397.
24. Santos E., Maia B., Ferriani A., Teixeira S. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. Handbook. From Biosynthesis to Human Health.: InTechOpen. 2017.
25. Flavonoids: Chemical Properties and Analytical Methodologies of Identification and Quantitation in Foods and Plants. / Corradini E., et al. *Natural Prod Res.* 2011. № 25. P. 469–495.
26. Isolation and Identification of the Five Novel Flavonoids from *Genipa americana* Leaves. / Silva M.P., et al. *Molecules.* 2018. № 23(10). P. 2521.
27. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* 2016. № 5. P. e47.
28. Flavonoids in Bone Erosive Diseases: Perspectives in Osteoporosis Treatment. / Bellavia D., et al. *Trends Endocrinol Metab.* 2021. № 32. P. 76–94.
29. Lakhanpal P, Rai DK. Quercetin: A versatile flavonoid. *Int J Med Update.* 2007. № 2. P. 22-37.
30. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. / Aguirre L., et al. *Open Nutraceuticals J.* 2011. № 4. P. 189–198.

31. Lee K.M., et al. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. / Lee K.M., et al. *J. Agric. Food Chem.* 2010. № 58. P. 5815–5820.
32. Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. / Dong Y.S., et al. *Int. J. Med. Sci.* 2014. № 11. P. 282–290.
33. Benzie I.F.F., Wachtel-Galor S. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Handbook. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.
34. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. / Salvamani S, et al. *Biomed Res Int.* 2014. 2014:480258.
35. Denny Joseph K.M., Muralidhara. Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013. № 40. P. 83-92.
36. Parasuraman S., Maithili K.S. Antioxidant and drug metabolism. *Free Radic Antioxid.* 2014. № 4. P. 1–2.
37. Liu, D.; Xu, Y. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. № 15. P. 1669–1678.
38. Tao W., He Z. ROS-responsive drug delivery systems for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci.* 2018. № 13(2). P. 101-112.
39. Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. against oxidative stress-induced neurotoxicity. / Ghaffari H., et al. *Cell Mol Neurobiol.* 2014. № 34(3). P. 323-31.
40. Xu D., Hu M.J., Wang Y.Q., Cui Y.L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules.* 2019. № 24(6). P. 1123.
41. Lourenço S.C., Moldão-Martins M., Alves V.D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules.* 2019. № 24(22). P. 4132.

42. Pretreated quercetin protects gerbil hippocampal CA1 pyramidal neurons from transient cerebral ischemic injury by increasing the expression of antioxidant enzymes. / Chen B.H., et al. *Neural Regen Res.* 2017. № 12(2). P. 220-227.
43. Neuroprotective effects of Quercetin on radiation-induced brain injury in rats. / Kale, A.; et al. *J. Radiat. Res.* 2018. № 59. P. 404–410.
44. Therapeutic role of quercetin on oxidative damage induced by acrylamide in rat brain. / Zargar S., et al. *Pharm Biol.* 2016. № 54(9). P. 1763-1767.
45. Ola M.S., Ahmed M.M., Shams S., Al-Rejaie S.S. Neuroprotective effects of quercetin in diabetic rat retina. *Saudi J Biol Sci.* 2017. № 24(6). P. 1186-1194.
46. Patil S.L., Rao N.B., Somashekarappa H.M., Rajashekhar K.P. Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. *Biomed J.* 2014. № 37(5). P. 305-13.
47. Quercetin protects radiation-induced DNA damage and apoptosis in kidney and bladder tissues of rats. / Ozyurt, H.; et al. *Free Radic. Res.* 2014. № 48. P. 1247–1255.
48. Patil S.L., Mallaiah S.H., Patil R.K. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J Med Phys.* 2013. № 38(2). P. 87-92.
49. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acute liver damage in mice. / Kalantari H, et al. *J Tradit Complement Med.* 2017. № 8(1). P. 120-127.
50. Quercetin reverses hypobaric hypoxia-induced hippocampal neurodegeneration and improves memory function in the rat. / Prasad, J.; et al. *High Alt. Med. Biol.* 2013. № 14. P. 383–394.
51. Protective effects of quercetin on UVB irradiation-induced cytotoxicity through ROS clearance in keratinocyte cells. / Zhu X., et al. *Oncol Rep.* 2017. № 37(1). P. 209-218.



52. Antiviral activity of Baicalein and quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. / Johari J., et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2012. № 13. P. 16785–16795.
53. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type 2. / Zandi K., et al. *Viol. J.* 2011. № 8. P. 560.
54. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. / Bachmetov L., et al. *J. Viral. Hepat.* 2012. № 19. P. 81–88.
55. Anti-inflammatory, antiviral, and quantitative study of quercetin-3-O-beta-D-glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. / Fan D., et al. *Fitoterapia.* 2011. № 82. P. 805–810.
56. Song J.H., Shim J.K., Choi H.J. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral-induced reactive oxygen species. *Viol. J.* 2011. № 8. P. 460.
57. Zheng Y.Y., Ma Y.T., Zhang J.Y., Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol.* 2020. № 17(5). P. 259-260.
58. The disturbed redox-balance in pulmonary fibrosis is modulated by the plant flavonoid quercetin. / Veith C., et al. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017. № 336. P. 40-48.
59. Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique. / Farrag Y., et al. *Int J Biol Macromol.* 2018. № 114. P. 426-433.
60. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro. / Wang S., et al. *J. Food Prot.* 2018. № 81. P. 68–78.
61. Jaisinghani R. Antibacterial properties of quercetin. *Microb. Res.* 2017. № 8.
62. Antimicrobial activity of a new class of phosphorylated and modified flavonoids. / Osonga F.J., et al. *ACS. Omega.* 2019. № 4. P. 12865–12871.

63. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. / Tasdemir D., et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. № 50. P. 1352–1364.

64. Li B., Yang M., Liu J.W., Yin G.T. Protective mechanism of quercetin on acute myocardial infarction in rats. *Genet Mol Res.* 2016. № 15(1). P. 15017117.

65. Protective Effect of Quercetin on Posttraumatic Cardiac Injury. / Jing Z., et al. *Sci Rep.* 2016. № 6. P. 30812.

66. Maurya A.K., Vinayak M. Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Mol Biol Rep.* 2015. № 42(9). P. 1419-1429.

67. Maurya A.K., Vinayak M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): key role of quercetin in cancer prevention. *Tumour Biol.* 2015. № 36(11). P. 8913-8924.

68. Chemopreventive effect of quercetin in MNU and testosterone induced prostate cancer of Sprague-Dawley rats. / Sharmila G, et al. *Nutr Cancer.* 2014. № 66(1). P. 38-46.

69. Mehta V, Parashar A, Udayabanu M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. *Physiol Behav.* 2017. № 171. P. 69-78.

70. Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitregic pathways. / Holzmann, I.; et al. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015. № 136. P. 55–63.

71. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. / Gao L., et al. *Int J Pharm.* 2011. № 404(1-2). P. 231-7.

72. Towards an understanding of the low bioavailability of quercetin: A study of its interaction with intestinal lipids. / Rich G.T., et al. *Nutrients*. 2017. № 9. P. 111.
73. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. / Walle T., et al. *J. Nutr.* 2005. № 135. P. 48–52.
74. Nemeth K., Piskula M.K. Food content, processing, absorption, and metabolism of onion flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007. № 47. P. 397–409.
75. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. / Hollman P.C., et al. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995. № 62. P. 1276–1282.
76. Scholz S., Williamson G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2007. № 77. P. 224–235.
77. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. / Ferry D.R., et al. *Clin Cancer Res.* 1996. № 2(4). P. 659-668.
78. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. / Erlund I, et al. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000. № 56(8). P. 545-53.
79. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. / Graefe E.U., et al. *J Clin Pharmacol.* 2001. № 41(5). P. 492-9.
80. Manach C., Donovan J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res.* 2004. № 38(8). P. 771-85.
81. Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability. / Smith AJ, et al. *Mol Pharm.* 2011. № 8(5). P. 1867-76.
82. Bioavailability and Metabolic Pharmacokinetics of Rutin and Quercetin in Rats. / Yang, C.-Y., et al. *J. Food. Drug Anal.* 2005. № 13. P. 5.
83. Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. Classification of Orally Administered Drugs on the World Health Organization Model List of Essential Medicines According to the Biopharmaceutics Classification System. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. № 58. P. 265– 278.

84. Razmara, R. S., Daneshfar, A., Sahraei R. Solubility of Quercetin in Water + Methanol and Water + Ethanol from (292.8 to 333.8) K. *J. Chem. Eng. Data* 2010. № 55. P. 3934–3936.
85. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. / Salehi B., et al. *ACS Omega*. 2020. № 5. P. 11849–11872.
86. Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: A review. / Manzoor M.F, et al. *Ultrason Sonochem*. 2021. № 78. 105686.
87. Tuning the Pharmacokinetic Performance of Quercetin by Cocrystallization. / Haskins M.M, et al. *Cryst Growth Des*. 2023. № 23(8). P. 6059-6066.
88. Lund K. C., Pantuso T. Combination Effects of Quercetin, Resveratrol and Curcumin on In Vitro Intestinal Absorption. *J. Restor. Med*. 2014. № 3. P. 112.
89. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991. № 175(3). P. 880-885.
90. Kavanagh, O. N. Harmonising Nomenclature in Pharmacopeial Texts. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2023. № 188. P. 227–230.
91. Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. / Li B., et al. *Carbohydr Polym*. 2013. № 92(2). P. 2033-2040.
92. Chen, X.; Yin, O.Q.P.; Zuo, Z.; Chow, M.S.S. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm. Res*. 2005. № 22. P. 892–901.
93. Wong M.Y., Chiu G.N. Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment. *Anticancer Drugs*. 2010. № 21(4). P. 401-10.
94. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: A liquid crystalline formulation. / Vicentini, F.; et al. *Lat Am J Pharm*. 2007. № 26 (6). P. 805-810.

95. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. / Kumari A., et al. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010. № 80(2). P. 184-92.
96. Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. / Sahoo N.G., et al. *J Pharm Sci*. 2011. № 100(6). P. 2379-90.
97. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. / Li H., et al. *J Control Release*. 2009. № 133(3). P. 238-44.
98. Bose S., Michniak-Kohn B. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *Eur J Pharm Sci*. 2013. № 48(3). P. 442-52.
99. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. / Vicentini F.T., et al. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008. № 69(3). P. 948-57.
100. Shaposhnik, Vladimir & Karpenko-jereb, Larisa. Priority of V. A. Kistyakovskii in the Discovery of Hydration. *Journal of Physical Chemistry A*. 2019. № 93. P. 2192-2196.
101. Gao Z. In vitro dissolution testing with flow-through method: a technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2009. № 10(4). P. 1401-1405.
102. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методикна практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019. № 8(2). P. 122–130.
103. І. В. Ковалевська, О. А. Рубан, В. О. Грудько. Дослідження вивільнення кверцетину з твердих дисперсій високомолекулярних речовин / *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. - Вип. 24(5).- С. 318-322.
104. A new approach to the chromatographic determination of quercetin water solubility / Zenkevich I.G., et al. *Analitika I Kontrol*. 2019. — Vol. 23. Issue 3. — P. 386-392.

105. Determination of dissociation constants of species oxidizable in aqueous solutions by air oxygen on an example of quercetin. / Zenkevich I.G., et al. *J. Analyt. Chem.*, 2010. Vol. 65, no. 4. P. 371-375.

106. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023ю № 3 (43). P. 58–66.

107. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. Development of a new solution for determining the solubility limit of quercetin and other poorly soluble substances in aqueous solutions using the method for determining total organic carbon. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 4(44). P. 54–62.

108. M9 Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers, Guidance for Industry U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2021

109. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies submitted in NDAs or INDs-general considerations. Draft guidance. Food and Drug Administration. United States Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2022.

110. "In Vitro-In Vivo Correlation for Extended Release Oral Dosage Forms," United States Pharmacopeial Convention, Inc. Pharmacopeial Forum Stimuli Article. 1988. P. 4160- 4161.

111. Physiological-based pharmacokinetic modeling trends in pharmaceutical drug development over the last 20-years; in-depth analysis of applications, organizations, and platforms. / El-Khateeb E, et al. *Biopharm Drug Dispos*. 2021. № 42(4). P. 107-117.

112. Advances in in-vitro bioequivalence testing methods for complex ophthalmic generic products. / Renukuntla J., et al. *Int J Pharm*. 2022. № 627:122209.

113. Anand O., Pepin X.J.H., Kolhatkar V., Seo P. The use of physiologically based pharmacokinetic analyses in biopharmaceutics applications-regulatory and industry perspectives. *Pharm Res.* 2022. № 39(8). P. 1681-700.
114. Pearce G.A., McLachlan A.J., Ramzan I. Bioequivalence: how, why, and what does it really mean? *J Pharm Pract Res.* 2004. № 34(3). P. 195-200.
115. Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. / Petersen B., et al. *Food Res Int.* 2016. № 88(Pt A). P. 159-165.
116. O'Farrell C., Stamatopoulos K., Simmons M., Batchelor H.. In Vitro Models to evaluate ingestible devices: present status and current trends. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021. № 178:113924.
117. Regulatory Experience with In Vivo In Vitro Correlations (IVIVC) in New Drug Applications. / Suarez-Sharp S., et al. *AAPS J.* 2016. № 18. P. 1379–1390.
118. Kaur P., Jiang X., Duan J., Stier E. Applications of In Vitro–In Vivo Correlations in Generic Drug Development: Case Studies. *AAPS J.* 2015. № 17. P. 1035–1039.
119. Davanço M.G., Campos D.R., de Carvalho P.O. In vitro—In vivo correlation in the development of oral drug formulation: A screenshot of the last two decades. *Int. J. Pharm.* 2020. № 580:119210.
120. PBPK Absorption Modeling: Establishing the In Vitro–In Vivo Link—Industry Perspective. / Stillhart C., et al. *AAPS J.* 2019. № 21. P. 19.
121. Da Silva Honório T., et al. In vitro-in vivo correlation of efavirenz tablets using Gastroplus®. *AAPS PharmSciTech.* 2013. № 14. P. 1244–1254.
122. Shen J., Burgess D.J. In vitro-in vivo correlation for complex non-oral drug products: Where do we stand? *J. Control. Release.* 2015. № 219. P. 644–651.
123. Development, and validation of in vitro-in vivo correlation (IVIVC) for estradiol transdermal drug delivery systems. / Yang Y., et al. *J. Control. Release.* 2015. № 210. P. 58–66.

124. FDA guidance for industry 1 dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. / Shah V.P., et al. *Dissolution Technol.* 1997. № 4. P. 15–22.
125. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1) Draft XXIII, European Medicines Agency. 2013.
126. Suitability of a minipig model in assessing clinical bioperformance of matrix and multiparticulate extended-release formulations for a BCS class III Drug development candidate. / Kesisoglou F, et al. *J Pharm Sci.* 2014. № 103(2). P. 636–642.
127. Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research.. Rockville: Food and Drug Administration. 2003. (Accessed 15 Dec 2014.)
128. Chakraborty A, Pandya K, Aggarwal D. Establishing prospective IVIVC for generic pharmaceuticals: methodologies assessment. *Open Drug Deliv J.* 2014. № 5. P. 1–7.
129. Report of Workshop on In Vitro and In Vivo Testing and Correlation for Oral Controlled/Modified-Release Dosage Forms. / Skelly, J. P., et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1990. № 79(9). P. 849-854.
130. In Vitro In Vivo Evaluation of Dosage Forms. United States Pharmacopeial Convention, Inc. USP XXIII, 1927-1929.
131. Workshop II Report Scale-up of Oral Extended Release Dosage Forms. / Skelly, J. P., et al. *Pharmaceutical Research*, 1993. № 10(12). P. 1800-1805.
132. Khanina, N. V.; Georgiyants, V. A.; Khanin, V. A.; Zupanets, I. A. The New Method to Study the Kinetics of Release of Hardly Soluble API from Solid Oral Dosage Forms on the Example of Quercetin. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry.* 2023. № 21 (3). P. 50 – 60.



## ДОДАТКИ

### Додаток А

#### Список публікацій здобувача

1. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 3 (43), 00\58–66. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293> (Особистий внесок – брала участь в проведенні експерименту та підготовці статті).
2. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a new solution for determining the solubility limit of quercetin and other poorly soluble substances in aqueous solutions using the method for determining total organic carbon. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 4(44), 54–62. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.286639> (Особистий внесок – брала участь в проведенні експерименту та підготовці статті).
3. Khanina, N. V.; Georgiyants, V. A.; Khanin, V. A.; Zupanets, I. A. The New Method to Study the Kinetics of Release of Hardly Soluble API from Solid Oral Dosage Forms on the Example of Quercetin. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry* 2023, 21 (3), 50 – 60. doi:<https://doi.org/10.24959/ophcj.23.290665> (Особистий внесок – брала участь в проведенні експерименту та узагальненні результатів експерименту, підготовці статті).
4. Ханіна Н. В., Георгіянц В. А., Ханін В. А. Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, - кверцетину: пат. № 152115 Україна. № и 2021 05955; заявл. 23.10.2021; опубл. 03.11.2021, Бюл. № 44 (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, розробці методу та оформленні патенту).

Продовж. дод. А

### Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Development of new approaches for studying the dissolution profiles of herbal preparations according to the requirements of the Biopharmaceutical Classification system. 10th International Pharmaceutical conference 'Science and practice': матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., постерна доповідь, 15 листопада 2019 р., м. Каунас, Литва: Lithuanian University of health Sciences, 2019 (Постерна доповідь, публікація тез).
2. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of flavonoids in herbal preparations. XI International scientific and practical conference 'Implementation of modern scientific opinions in practice'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 20-21 березня 2023 р., м. Більбао, Іспанія, European conference, (0,4 ECTS credits), 2023 (публікація тез).
3. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of rutin in herbal preparations. XI International scientific and practical conference 'Problems of the development of science and the view of society'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 21-24 березня 2023 р., м. Грац, Австрія, International Science Group, (0,4 ECTS credits), 2023 (публікація тез).
4. Nataliia Khanina, Vadim Khanin, Victoria Georgiyants. Determination of caffeic acid in herbal preparations. International scientific and practical conference 'Modern chemistry of medicines'; матеріали Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 18 травня 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, (0,2 ECTS credits), 2023 (публікація тез).
5. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Новий підхід вирішення проблеми біолейверу для речовин 3 та 4 класу БСК. International scientific and practical conference «Безперевний професійний розвиток фармацевтичних працівників:

сучасний стан, проблеми та перспективи»; матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, 01 листопада 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, (0,2 ECTS credits ), 2023. Стор. 299-301 (публікація тез).

6. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Новий підхід вивчення вивільнення кверцетину у процесі фармакокінетичних досліджень. International scientific and practical conference «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології»; матеріали III Міжнародна наук.-практ. інтернет-конф., 24 листопада 2023 р., м. Харків, Україна, НФаУ, (0,2 ECTS credits ), 2023. (публікація тез).

7. Ханіна Н.В., Георгіянц В. А., Ханін В.А. Розробка методики вибору речовини маркеру при аналізі комбінованих рослинних препаратів, що містять кверцетин. International scientific and practical conference ‘X Innovate scientific research: theory and practice’; матеріали Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнародною участю, 21-24 листопада 2023 р., м. Стокгольм, Швеція, (0,8 ECTS credits )2023 (публікація тез).

## Додаток Б

## Акт впровадження (15 листопада 2023)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ  
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ  
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ  
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР  
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UKRAINE  
ON MEDICINES  
AND DRUGS CONTROL  
STATE ENTERPRISE  
"UKRAINIAN SCIENTIFIC  
PHARMACOPEIAL CENTER  
FOR QUALITY OF MEDICINES"

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. [http:// www.sphu.org](http://www.sphu.org), E-mail: [phukr@phukr.kharkov.ua](mailto:phukr@phukr.kharkov.ua)  
Тел. +38 099 2932583 ФСЗ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,  
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Олександр Гризодуб

Директор

Фармакопейний центр»

Шоф

Олександр ГРИЗОДУБ

2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів досліджень Наталії Ханіної у Державну Фармакопею України

Даний акт складений у тому, що Наталія Ханіна брала участь у розробці національних текстів Державної Фармакопеї України (ДФУ) 5.3.N.3. «ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТЬ», та 5.3.N.1. «СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ХІМІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ», які будуть включені у ДФУ 2.7, Том 2.

Керівник наукового напрямку  
«Стандартні зразки, валідація,  
верифікація, метрологія»  
д. фарм. н., с. н. с.

Дмитро ЛЕОНТЬЄВ

Відповідальний за впровадження:

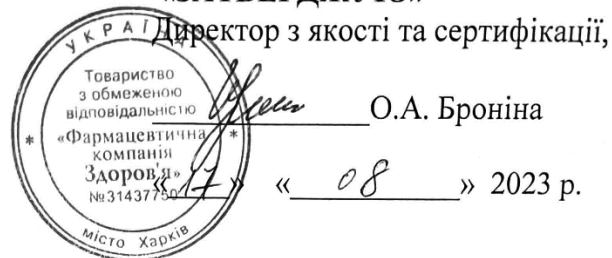
Завідуючий відділом Державної  
Фармакопеї України  
д. фарм. н., с. н. с.

Андрій КОТОВ

Продовження дод. Б -1

## Акт впровадження (17 серпня 2023 року)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозицій для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо способу визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, - кверцетину.
- 2. Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, Ханіна Н.В., проф. Георгіянц В.О.
- 3. Джерела інформації:** 1. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕЖІ РОЗЧИННОСТІ ДЛЯ РЕЧОВИНИ, ОБМЕЖЕНО РОЗЧИННОЇ У ВОДІ, - КВЕРЦЕТИНУ: пат. 152115 Україна: G01N 30/02, B01D 15/08 № и 2021 05955; заявл. 03.11.2022, Бюл. № 44, 4с.  
2. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of poorly soluble in water substances on the example of quercetin. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 3 (43), 58–66. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293>
- 4. Де впроваджено:** в виробництві та контролю якості лікарської сировини та препаратів, що з неї виготовляються.
- 5. Форма впровадження:** проект нормативної документації (специфікації) що до контролю якості лікарської сировини.
- 6. Ефект від впровадження:** створення умов для контролю якості лікарської сировини та препаратів відповідно до вимог НПП та фармакопеї за тестами «Спостережуване розчинення», тест «Розчинення» для твердих дозованих одиниць та однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу.
- 7. Строки впровадження:** 2023 – 2024 рік.

« 17 » « 08 » 2023 р.

Начальник фітохімічного цеху,  
кандидат фармацевтичних наук

 Зупанець М.В.

Відповідальний за впровадження:

Продовження дод. Б-2

## Акт впровадження (30 листопада 2023 р.)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи  
Запорізького державного  
медико-фармацевтичного університету  
доктор медичних наук,  
проф. Валерій ТУМАНСЬКИЙ

« \_\_\_\_\_ » 2023 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозицій для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо проведення тесту розчинення для важкорозчинних у водному середовищі речовин, в процесі фармацевтичної розробки.
- 2. Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, кандидат Ph.D. Н.В. Ханіна, проф. Георгіянц, канд. технічних наук В.А. Ханін
- 3. Джерела інформації:** 1. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 3 (43), 00\58–66. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293>  
2. Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, - кверцетину : пат. 152115 UA: G01N 30/02 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01) Ханіна Н.В., Георгіянц В.А., Ханін В.А.; Володілець (володільці): Національний фармацевтичний університет,– № у 2021 05955, 02.11.2022, Бюл.№ 44.
- 4. Де впроваджено:** в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЗДМФУ дисципліни: «Фармацевтична хімія», «Стандартизація лікарських засобів».
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань розробки аналітичних методів вивчення кінетики розчинення важкорозчинних речовин
- 7. Строки впровадження:** 01 травня 2023 – 30 листопада 2023 навчальний рік.

«30» листопада 2023 р.

Відповідальний за впровадження:  
Зав. каф. фармацевтичної, органічної  
та біоорганічної хімії  
ЗДМФУ д.фарм.н., проф.

Людмила КУЧЕРЕНКО

Продовження дод. Б-3  
**Акт впровадження (21 листопада 2023р.)**

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Проректор з наукової роботи  
 Львівського національного  
 медичного університету  
 імені Данила Галицького  
 доктор медичних наук,  
 проф. Вікторія СЕРГІЄНКО  
 «*Вікторія Сергієнко*» 2023 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозицій для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо проведення тесту розчинення для важкорозчинних у водному середовищі речовин, в процесі фармацевтичної розробки.
2. **Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, кандидат Ph.D. Н.В. Ханіна, проф. Георгіянец, канд. технічних наук В.А. Ханін
3. **Джерела інформації:** 1. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 3 (43), 00\58–66. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293>
2. Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, - кверцетину : пат. 152115 UA: G01N 30/02 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01) Ханіна Н.В., Георгіянец В.А., Ханін В.А.; Володільць (володільці): Національний фармацевтичний університет, – № u 2021 05955, 02.11.2022, Бюл.№ 44.
4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЛНМУ ім. Д. Галицького дисципліни: «Фармацевтична хімія», «Стандартизація лікарських засобів».
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань розробки аналітичних методів вивчення кінетики розчинення важкорозчинних речовин
7. **Строки впровадження:** 2023 – 2024 навчальний рік.

«*Вікторія Сергієнко*» «*Вікторія Сергієнко*» 2023 р.

Відповідальний за впровадження:  
 Зав. каф. фармацевтичної, органічної і  
 біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького  
 д.фарм.н., проф.

*Роман ЛЕСИК*  
 Роман ЛЕСИК

Продовження дод. Б-3

## Акт впровадження (07 вересня 2023р.)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
 Професор ЗВО Тернопільського  
 національного медичного університету  
 імені І. Я. Горбачевського з наукової  
 роботи проф. І.М. Кліщ  
 « 7 » « Вересня » 2023 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозицій для впровадження:** результати експериментальних досліджень щодо проведення тесту розчинення для важкорозчинних у водному середовищі речовин на прикладі кверцетину в процесі фармацевтичної розробки.
- 2. Установа, автор:** 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, здобувач вищої освіти Н.В. Ханіна, проф. В.А. Георгіянц, канд. технічних наук В.А. Ханін
- 3. Джерела інформації:** 1. Khanina, N., Georgiyants, V., Khanin, V. (2023). Development of a method for the quantitative determination of the solubility limits of substances lowly soluble in water on the example of quercetin. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 3 (43), 00\58–66. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.283293>
2. Спосіб визначення межі розчинності для речовини, обмежено розчинної у воді, - кверцетину : пат. 152115 UA: G01N 30/02 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01) Ханіна Н.В., Георгіянц В.А., Ханін В.А.; Національний фармацевтичний університет, – № у 2021 05955, 02.11.2022, Бюл.№ 44.
- 4. Де впроваджено:** в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ імені І. Я. Горбачевського
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі, наукові дослідження.
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань розробки аналітичних методів вивчення кінетики розчинення важкорозчинних речовин
- 7. Строки впровадження:** 2023 – 2024 навчальний рік.

« 5 » « Вересня » 2023 р.

Відповідальний за впровадження:  
 Зав. каф. фармацевтичної хімії  
 ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського д.фарм.н., проф.

 Л.С.Логойда



## Додаток В

**Валідація методики визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі методом ВЕРХ-МС**

Для мас-спектрометричної методики ВЕРХ, кількісного визначення кверцетину у водних розчинах, було проведено валідацію. В рамках цієї валідації показано, що похибка визначення вмісту кверцетину в зразку не перевищує максимальної похибки для зазначеної методики у всьому діапазоні концентрацій 95% - 105% від номіналу. Нижче наведені результати.

Валідацію методики кількісного визначення субстанції кверцетину проводили за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, точність, прецизійність та внутрішньолабораторна прецизійність.

Для оцінки похибки пробопідготовки модельних розчинів і стандартного розчину розраховували теоретичні значення невизначеності аналітичної операції, яка становила  $\Delta_{sp}=1,06\% \leq 5 \cdot 0,32=1,6\%$ . Таким чином, розрахована невизначеність пробопідготовки та аналізу в цілому повинна забезпечувати достатню точність вимірювання.

Розчини для хроматографії готували згідно з описаним вище аналітичним методом. Холостий розчин готували аналогічно досліджуваному.

Оцінку лінійності проводили в діапазоні (80-120%) застосування методики за стандартною методикою. Дослідження характеру залежності сигналу від концентрації проводили з використанням 9 модельних розчинів для аналізу з точними концентраційними вагами: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120%. У той же час концентрація, прийнята за 100%, була концентрацією кверцетину, яка знаходиться в середині діапазону, що охоплює мінімальну та максимальну концентрації кверцетину.

Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ. Побудова калібрувального графіка

здійснювалась у нормованих координатах. Для кожного з дев'яти зразків розчинів розраховували середні значення площі піку ( $S_i$ ). Отримані результати оброблено методом найменших квадратів для прямої  $Y = b \cdot x + a$ . Розраховані статистичні значення  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (кінцеве стандартне відхилення) і  $r$  (коефіцієнт кореляції) наведені в таблиці 1.

У нашому випадку вимоги до параметрів лінійної регресії виконуються у всьому діапазоні застосування методики (80 - 120%).

Таблиця 1

Параметри та значення лінійної регресії

Параметри	Значення		
b	3,9034		
$S_b$	0,0059065		
a	0,79		
$S_a$	0,41272		
$s_0$	0,71375		
$s_0 / b$	0,183		
$s_Y$	157,23		
r	0,99999		
Розчин порівняння	Середнє $S_{St}$	$C_{St}$	$RSD_{St}, \%$
Reference	391,5	100	0,181

Для вимірювання та розрахунку метрологічної оцінки прецизійності та точності методу було отримано три значення площі піку для розчину порівняння та 27 значень площі піку для модельних розчинів. Розраховували фактичні значення, відношення середніх значень площ піків для кожного з 27 розчинів до середнього значення площ піків розчину порівняння, отримуючи значення  $X_i = (C_i/C_{st}) \cdot 100\%$ ,  $Y_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100\%$ , а також значення  $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$ , яке є концентрацією, знайденою у відсотках від вхідного матеріалу. Результати розрахунків наведені в таблицях 2-4.

Таблиця 2

### Значення дисперсії

Випробовувані розчини	назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$RSD_i, \%$
1	5	19,45	5	0,3636
2	10	39,75	10	0,17789
3	20	79,65	20	0,08878
4	30	117,65	30	0,0601
5	60	236,25	60	0,02993
6	70	273,55	70	0,02585
7	80	313,65	80	0,02254
8	90	351,45	90	0,02012
9	100	390,85	100	0,018092
10	120	469,15	120	0,015072

Note: Student (95, 1, 11) = 1,7956

Вимоги до максимально допустимого  $RSD_p$ : 1,67%

Таблиця 9

Results of analysis of model solutions and their statistical processing

Випробовувані розчини	Назва	Середнє $S_i$	$C_i$	$Y_i$	$X_i$	$RSD_i, \%$	$Z_i, \%$
1	5	19,45	5	4,97	5,00	0,36	99,36
2	10	39,75	10	10,15	10,00	0,18	101,53
3	20	79,65	20	20,34	20,00	0,09	101,72
4	30	117,65	30	30,05	30,00	0,06	100,17
5	60	236,25	60	60,34	60,00	0,03	100,57
6	70	273,55	70	69,87	70,00	0,03	99,82
7	80	313,65	80	80,11	80,00	0,02	100,14
8	90	351,45	90	89,77	90,00	0,02	99,74
9	100	390,85	100	99,83	100,00	0,02	99,83
10	120	469,15	120	119,83	120,00	0,02	99,86

Таблиця 10

### Параметри точності та правильності

Валідаційний параметр	Параметр	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновки
Правильність	$\Delta_Z$	1,43	$\leq 3$		Відповідає

Точність	$ Z_{\text{cp}} - 100 $	$ 0,28 $	$\leq 0,45$	$\leq 0,96$	Відповідає за першим критерієм
----------	-------------------------	----------	-------------	-------------	--------------------------------

Note:  $s_z (\%) = 0,78103$ ; Student (95, 1, 9) = 1,83310

Вимоги до правильності виконуються за першим критерієм.

Для оцінки внутрішньолабораторної точності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту речовин, який повинен бути меншим за гранично допустиму похибку результатів аналізу:  $\Delta z \leq 1,6 \%$ . Тести проводили з використанням однієї і тієї ж серії препарату різними аналітиками на одному хроматографі в різні дні з використанням посуду різного розміру.

Внутрішньолабораторна точність підтверджується тим, що значення відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ( $\Delta z = 0,22\% \leq 1,6\%$ ).

Оскільки метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що використовується в методі, є специфічним, для підтвердження специфічності методу достатньо виконати всі вимоги до критеріїв лінійності, точності, прецизійності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Продовження дод. В

**Валідація методики визначення межі розчинності кверцетину у водному середовищі методом визначення загального органічного вуглецю**

Валідація методики ТОС кількісного визначення субстанції кверцетину проводилась за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, прецизійність правильність та внутрішньолабораторна прецизійність.

Щоб оцінити похибку пробопідготовки модельних розчинів та розчину стандарту, були розраховані теоретичні значення невизначеності аналітичної операції, яка склала  $\Delta_{sp}=5 \cdot 0,32=1,6\%$ . При цьому реальна похибка приготування проб для використовуваної при проведенні вимірювань методики ТОС склала 0,2%, що набагато менше встановленого критерію. Наведені розрахунки показали незначність впливу похибки пробопідготовки на результат кількісного визначення.

Розчини для проведення валідаційних вимірювань готували за наступною методикою: точне навішування ретельно перетертого та висушеного до постійної маси зразка субстанції кверцетину, вміщували в колбу на 1000 мл, додавали 100 мл 1М соляної кислоти. Після цього розчиняли навішування на ультразвуковій бані протягом 10 хвилин і доводили до мітки водою з наступним перемішуванням.

Холостий розчин готували аналогічно досліджуваному розчину.

Оцінку лінійності проводили на діапазоні (80-120%) застосування методики за методом стандарту. Вивчення характеру залежності сигналу як функції концентрації проводили, використовуючи 9 модельних розчинів для аналізу з точними наважками концентрацій: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120%. При цьому концентрацією яку брали за 100% була концентрація кверцетину (6 мг/мл), що знаходиться у середині діапазону, що охоплює min та max концентрації кверцетину.

Одержані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів згідно з вимогами ДФУ.

Розраховані статистичні величини  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$  (остаточне стандартне відхилення) та  $r$  (коефіцієнт кореляції) наведено в табл. 1.

Таблиця 1

**Параметри лінійності та критерії (для наведених значень)**

Параметри	Значення
b	63,416556
Sb	0,28466098
a	-0,18143333
Sa	1,7207279
RSD <sub>0</sub>	0,66149233
RSD <sub>0</sub> /b	0,010430909
RSD <sub>y</sub>	49,126212
r	0,99991941

Побудову калібрувального графіка проводили в нормалізованих координатах. Для кожного з дев'яти розчинів зразка розраховували середні значення площі піку ( $S_i$ ). Одержані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої  $Y = b \cdot x + a$  (Табл. 2).

Таблиця 2

**Параметри лінійності та критерії (для наведених значень)**

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	1,0008136	-	-	-
Sb	0,0044924008	-	-	-
a	-0,047721753	<=   0,84160382	<=   7,9	витримуються за першим критерієм
Sa	0,45259684	-	-	-
RSD <sub>0</sub>	0,17398993	-	-	-
RSD <sub>0</sub> /b	0,17384849	<=   2,6888949	-	витримуються
RSD <sub>y</sub>	12,909944	-	-	-
r	0,99990918	>   0,97806905	-	витримуються

--	--	--	--	--	--

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

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності і правильності методики було одержано три значення площ піків для розчину порівняння та 27 значень площ піків для модельних розчинів. Розраховували фактичні величини ( $X_{i\text{факт}}$ ), відношення середніх значень площ піків для кожного з 27 розчинів до середнього значення площі піку розчину порівняння, одержуючи величини  $X_i = (C_i/C_{st}) \cdot 100\%$ ,  $Y_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100\%$ , а також величину  $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$ , яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної. Результати розрахунків наведені в табл. 3.

Таблиця 3

### Параметри точності та правильності

	Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
Точність	$\Delta_Z$	0,30297491	$\leq 5$		витримуються
Правильність	$ Z_{cp} - 100 $	0,031925498	$\leq$ 0,095809079	$\leq 1,58$	витримуються за першим критерієм

Для оцінки внутрішньолабораторної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту речовин, який повинен бути меншим за максимально допустиму невизначеність результатів аналізу:  $\Delta z \leq 1,0 \%$ . Випробування проводили з використанням однієї серії кверцетину різними аналітиками на тому самому аналізаторі вуглецю в різні дні з використанням різного мірного посуду. Отримане значення невизначеності результатів аналізу становило 0,94%.

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату відповідає критерію прийнятності.

Для доказу того, що методика ТОС є специфічною, можна вважати достатньо, щоб виконувались всі вимоги до критеріїв лінійності, правильності, прецизійності та внутрішньолабораторної прецизійності.

У процесі валідації методики ТОС кількісного визначення субстанції кверцетину були отримані результати, що відповідають критеріям правильності, лінійності, прецизійності та внутрішньолабораторної прецизійності, що підтверджує специфічність дослідженої методики ТОС.

Таким чином, отримані результати дослідження валідаційних параметрів методики ТОС кількісного визначення субстанції кверцетину, що повністю відповідають вимогам установлень критеріїв, що дозволяє зробити взвод про незначний вплив похибки методики на результат кількісного визначення. Дана методика дозволяє коректно вимірювати концентрацію кверцетину із заданою точністю (1,6 %) та може бути відтворена в умовах лабораторій.

Проведена верифікація методики показала, що за точністю (не більше 2%) та відтворюваності (0,94%) одержуваних результатів методика повністю відповідає вимогам, що закладалися при її розробці, похибка не більше 5% та відтворюваність не більше 1,0%.