

К.И. Ровкина^{1,2}, С.В. Кривошеков¹, А.М. Гурьев¹, М.В. Белоусов^{1,2}
**ВАЛИДАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ БЕРЕЗЫ**

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Томск

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет», г. Томск

Разработка методик количественного определения активных фармацевтических субстанций, планируемых к включению в нормативную документацию, требует проведения валидационных мероприятий. В представленной статье приведены результаты валидации спектрофотометрической методики количественного определения полисахаридов листьев березы (ПСfВ), обладающих гиполипидемической активностью. Предложенная методика отличается специфичностью, линейностью (0,04–0,12 мг/мл), правильностью в диапазоне содержаний 75–120% (2,8–4,1%) и прецизионна в условиях повторяемости (0,25–0,44 %) и воспроизводимости (0,44–0,89%). Таким образом, показана пригодность методики количественного спектрофотометрического определения ПСfВ для включения в разрабатываемую нормативную документацию на предлагаемую субстанцию.

Ключевые слова: аналитическая область, линейность, специфичность, правильность, прецизионность.

K.I. Rovkina, S.V. Krivoshchekov, A.M. Guriev, M.V. Belousov
**VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
FOR QUANTIFICATION OF BIRCH POLYSACCHARIDES**

The development of methods for the quantitative determination of active pharmaceutical substances planned to be included in the regulatory documentation requires validation activities. This article presents the results of the validation of a spectrophotometric method for the quantitative determination of birch leaves polysaccharides (PSBl) with lipid-lowering activity. The proposed method is distinguished by specificity, linearity (0.04–0.12 mg / ml), correctness in the range of contents of 75–120% (2.8–4.1%) and precision under repeatability conditions (0.25–0.44 %) and reproducibility (0.44–0.89%). Thus, the suitability of the technique for quantitative spectrophotometric determination of PSBl for inclusion in the regulatory documentation for a substance being developed is shown.

Key words: analytical domain, linearity, specificity, accuracy, precision.

В настоящее время, когда требования к лекарственному регулированию не перестают возрастать, становится необходимым обеспечить надежность результатов, получаемых при проведении контроля качества новых лекарственных средств (ЛС). Регулирующие органы, такие как Food and Drug Administration (США) и Научный центр экспертизы средств медицинского применения (Россия), представляют руководящие принципы для валидации аналитических и биоаналитических методов, применяемых к фармацевтическим препаратам. В то же время проблема стандартизации лекарственных средств природного происхождения, которые востребованы у 80 % населения развивающихся стран, стоит обособленно [1]. При разработке методов контроля качества ЛС, полученных из растительного сырья, исследователи сталкиваются с целым рядом проблем. Растительное сырье является многокомпонентной системой, представленной веществами с различной химической структурой и биологической активностью, содержание и соотношение которых зависят от множества факторов, таких как хемораса, фаза вегетации, место произрастания, метод сбора и подготовки, растительные препараты, полученные из одного вида сырья. Компоненты растительного сырья могут иметь различные содержания как действующих, так и балластных

веществ и существенно отличаться по показателям качества и безопасности [2–4]. Соответственно, предлагаемые аналитические методики идентификации и количественного определения должны обеспечивать надлежащий контроль качества ЛС и верифицировать его соответствие нормативным требованиям [5].

В развитых странах также возрастает актуальность использования натуральных препаратов вследствие множественности проявлений ятрогенных эффектов, обусловленных применением синтетических ЛС [1]. Данное исследование также показало, что 57% пациентов не обсуждают использование растительных препаратов с врачом, так как эти препараты, как правило, считаются безопасными. Тем не менее есть сообщения о случаях серьезных побочных эффектов после приема растительных препаратов. Во многих случаях токсичность обусловлена примесными веществами или фальсификатами действующих веществ. Поэтому контроль качества препаратов растительного происхождения является актуальной задачей фармацевтической отрасли.

Нами проведено валидационное исследование разработанной ранее методики количественного спектрофотометрического определения полисахаридов березы [6], охватывающее такие параметры, как аналитическая

область, линейность, специфичность, правильность, прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Материал и методы

Полисахариды выделены по известной технологии [7] из воздушно-сухого сырья – листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.), собранных в окрестностях г. Томска в июне 2017 г. Растворы готовили с использованием ультрачистой воды (электрическая проводимость $\leq 0,4$ мкСм/см), реагентов: антрон ($\geq 96\%$) Sigma-Aldrich (США), серная кислота (ЧДА) ЭКОС-1 (Россия), стандарты рамнозы моногидрата ($\geq 99\%$) и яблочного пектина Sigma-Aldrich (США). Для всех измерений оптической плотности использовался спектрофотометр UNICO2800 (UNICO, США). В качестве альтернативного спектрофотометра использовали спектрофотометр B-1100 (ECOVIEW, Россия) для определения показателя воспроизводимости.

Для определения ПСfВ методом УФ-спектрофотометрии нами использована ранее разработанная методика. Схема анализа представлена на рис. 1.



Рис. 1. Схема методики количественного определения ПСfВ

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [8-9].

Линейность и аналитическую область методики определяли на пяти уровнях концентраций стандартных растворов (0,04, 0,06, 0,08, 0,10 и 0,12 мг/мл). Для этого аликвоту 0,4 – 1,2 мл раствора ПСfВ (1,0 мг/мл) помещали в пробирку Vivaspin Turbo 4 и центрифугировали 10 минут при $4,4 \times 10^3$ об/мин, после чего добавляли 2 мл воды и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатант количественно переносили в мерную колбу на 10 мл, водой доводили объем раствора до метки. Определяли оптическую плотность растворов при длине волны 625 нм.

По полученным значениям оптической плотности строили градуировочный график.

Специфичность разработанной методики определяли, изучив влияние рамнозы и яблочного пектина на проведение и результаты определения. Согласно разработанной методике проведен анализ с использованием в качестве испытуемых растворов: 1) ПСfВ; 2) ПСfВ+рамноза; 3) ПСfВ+яблочный пектин; 4) яблочный пектин.

Правильность методики устанавливали путём определения количественного содержания ПСfВ в модельных растворах для четырех уровней концентраций: 0,05; 0,075; 0,10 и 0,12 мг/мл (содержание ПСfВ 50, 75, 100 и 120% соответственно). Правильность оценивали путем расчета относительного стандартного отклонения (δ , %) результатов.

Прецизионность методики определяли в условиях повторяемости и воспроизводимости. Проверку повторяемости проводили в трехуровневом эксперименте по 6 параллельных определений выбранных концентраций.

Воспроизводимость методики оценивали в совместных экспериментах в двух различных лабораториях СибГМУ (Лаборатория контроля качества ЦВТ и Лаборатория инновационных фармацевтических технологий ЦНИЛ) разными операторами на различных спектрофотометрах по шесть образцов для трех уровней концентрации.

При анализе повторяемости и воспроизводимости верхнему уровню соответствовала навеска 80 мг (80%), среднему – 100 мг (100%) и нижнему уровню – 120 мг (120%).

Результаты и обсуждения

Специфичность методики заключается в ее способности достоверно определять анализируемое вещество в присутствии веществ, которыми легко можно фальсифицировать препарат. Такими фальсификаторами для ПСfВ могут являться коммерчески доступные моносахара и пектиновые полисахариды. В эксперименте показано, что добавка мономера рамнозы удаляется на стадии ультрафильтрации (ввиду ее низкой молекулярной массы), поэтому ее присутствие в анализируемой пробе не влияет на поглощение при аналитической длине волны (рис. 2).

Молекулярная масса яблочного пектина, аналогично ПСfВ, превышает порог отсеивания фильтра в 100 кДа, однако на величину оптического поглощения яблочный пектин не оказывал влияния. Таким образом, можно сделать вывод, что разрабатываемая методика валидна по показателю специфичности.

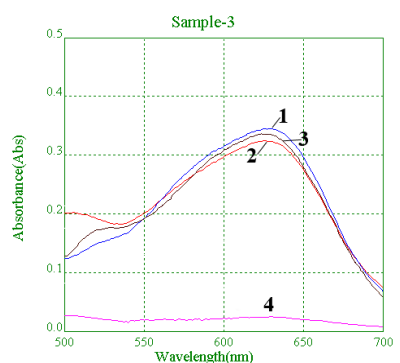


Рис. 2. Электронные спектры, полученные при определении специфичности (1) ПСfВ; 2) ПСfВ+рамноза; 3) ПСfВ+яблочный пектин; 4) яблочный пектин)

Аналитическая область, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал содержаний ПСfВ от 40 до 120%.

Уравнение $Abs = 4,794 \times C - 0,0381$, коэффициент корреляции составляет $R^2 = 0,9965$, что свидетельствует об удовлетворительной линейности зависимости оптической плотности от концентрации ПСfВ в изучаемом диапазоне.

Результаты определения правильности методики представлены в табл. 1. Показано, что методика является правильной, и относительная ошибка в диапазоне содержаний 75-120% не превышает 5% и достигает 6,7% близости предела количественного определения.

Анализ полученных данных оценки повторяемости (табл. 2) свидетельствует о ста-

тистической однородности выборок, отражая прецизионность методики в условиях повторяемости в диапазоне содержаний ПСfВ 80-120% ($n=6$, $p=0,95$).

Таблица 1
Оценка правильности предлагаемой методики

| Содержание ПСfВ в растворе, мг/мл теоретическое | найденное | δ , % | $\bar{\delta}$, % |
|--|-------------------------|----------------------|--------------------|
| | | | |
| 0,100 | 0,103 0,097 0,103 | 3,47 2,80 3,00 | 3,1 |
| 0,075 | 0,072 0,079 0,077 | 4,67 4,84 2,67 | 4,1 |
| 0,050 | 0,053 0,054 0,048 | 6,67 8,89 4,67 | 6,7 |

В условиях разработанной методики анализа сходимость в условиях повторяемости (σ_r) составила 0,25-0,44 %.

Для проверки гипотезы об однородности двух выборок использован двухсторонний F-критерий. Табличное значение $F(0,025, 5, 5) = 7,15$ сравнивали с расчетным ($F_{расч.} = S^2_{max} / S^2_{min}$), при выполнении неравенство $F_{расч.} < F(0,025, 5, 5)$ принимали за нуль-гипотезу и рассчитывали относительное отклонение ($RSD\%$, σ_R) по выборке $n=12$ (табл. 3).

Таблица 2

Оценка повторяемости

| $X_{ист.}\%$ | $X_{ср.}\%$ | S_x | ΔX | $\sigma_r, \%$ |
|--------------|-------------|-------|------------|----------------|
| 80 | 79,90 | 0,349 | 0,90 | 0,44 |
| 100 | 100,57 | 0,327 | 0,84 | 0,33 |
| 120 | 120,73 | 0,302 | 0,78 | 0,25 |

Таблица 3

Оценка воспроизводимости

| $X_{ист.}\%$ | $X_{ср.г.}\%$ | | F | S_x | $\sigma_R, \%$ |
|--------------|---------------|--------|------|-------|----------------|
| 80 | 79,90 | 80,40 | 1,36 | 0,71 | 0,89 |
| 100 | 100,57 | 101,15 | 1,73 | 0,61 | 0,61 |
| 120 | 120,73 | 121,06 | 1,55 | 0,53 | 0,44 |

Значения параметров воспроизводимости, приведенные в табл. 3, показывают удовлетворительную сходимость результатов определения методики в условиях межлабораторной прецизионности. Соответственно, предлагаемая аналитическая методика валидна по показателю воспроизводимости в исследуемом диапазоне содержаний ПСfВ.

Заключение

Разработанная методика количественного определения ПСfВ на основе фармакопейного андрон-серного метода валидирована по показа-

телям: специфичность, линейность (0,04-0,12 мг/мл), правильность в диапазоне содержаний 75-120 % (2,8-4,1%), и прецизионна в условиях повторяемости (0,25-0,44%) и воспроизводимости (0,44-0,89%). Таким образом, предложенная методика количественного спектрофотометрического определения ПСfВ может быть включена в нормативную документацию на субстанцию полисахаридов березы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0132.

Сведения об авторах статьи:

Ровкина Ксения Игоревна – аспирант Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО НИ ТПУ. Адрес: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30. E-mail: rki91@bk.ru.

Кривошеков Сергей Владимирович – м.н.с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: ksv_tsu@mail.ru.

Гурьев Артем Михайлович – д.фарм.н., руководитель Центра внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: titan-m@mail.ru.

Белоусов Михаил Валерьевич – д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтического анализа ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: mvb63@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mosihuzzaman, M. Protocols for safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine / M. Mosihuzzaman, M.I. Choudhari. // *Pure Appl. Chem.* – 2008. № 80. – P. 2195-2230.
2. Юнусова, Ф.М. Определение содержания биологически активных веществ в плодах облепихи дагестанских популяций /Ф.М. Юнусова, А.Ш. Рамазанов, К.М. Юнусов // *Химия растительного сырья.* – 2009. – № 1. – С. 109-111.
3. Качество сырья лекарственных растений при выращивании в антропогенно-нарушенных регионах западной сибери на примере *Hypericum perforatum L.* и *Leonurus quinquelobatus Gilib* / Ю.В. Загурская [и др.] // *Химия растительного сырья.* – 2013. – № 4. – С. 141-150.
4. Зависимость состава эфирного масла *Monarda didyma L.* (lamiaceae) от возраста растений и характера сырья / М.А. Мяделец [и др.] // *Химия растительного сырья.* – 2014. – № 1. – С. 215-219.
5. Choosing chemical markers for quality assurance of complex herbal medicine: development and application of the herbs MaRS criteria / A. Bensoussan [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2015. – № 97(6). – P.628-640.
6. Разработка методики количественного определения полисахаридов листьев березы / К.И. Ровкина [и др.] // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2019. – № 1.
7. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (rosaceae) из флоры Республики Башкортостан / С.Р. Хасанова [и др.] // *Растительные ресурсы.* – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 397-406.
8. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.
9. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации / Н.В. Юргель [и др.] – М.: «Спорт и культура – 2000», 2007. – 192 с.

REFERENCES

1. Mosihuzzaman, M. Protocols for safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine / M. Mosihuzzaman, M.I. Choudhari. // *Pure Appl. Chem.* – 2008. № 80. – P. 2195-2230.
2. Yunusova, F.M. Opredelenie sodержaniya biologicheskii aktivnykh veshchestv v plodakh oblepihi dagestanskikh populyacij. /F.M. Yunusova, A.SH. Ramazanov, K.M. Yunusov // *Himiya rastitel'nogo syr'ya.* – 2009. – № 1. – S. 109-111. [In Russ].
3. Kachestvo syr'ya lekarstvennykh rastenij pri vyrashchivani v antropogenno narushennykh regionah zapadnoj sibiri na primere *Hypericum perforatum L.* i *Leonurus quinquelobatus Gilib.* / YU.V. Zagurskaya [i dr.] // *Himiya rastitel'nogo syr'ya.* – 2013. – № 4. – S. 141-150. [In Russ].
4. Zavisimost' sostava ehfirnogo masla *Monarda didyma L.* (lamiaceae) ot vozrasta rastenij i haraktera syr'ya. / M.A. Myadec [i dr.] // *Himiya rastitel'nogo syr'ya.* – 2014. – № 1. – С. 215-219.5. [In Russ].
5. Choosing chemical markers for quality assurance of complex herbal medicine: development and application of the herbs MaRS criteria. / A. Bensoussan [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2015. – № 97(6). – P.628-640.
6. Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredeleniya polisaharidov list'ev berezy / K.I. Rovkina [i dr.] // *Medicinskij vestnik Bashkortostana.* – 2019. – №1. [In Russ].
7. Komponentnyj sostav polisaharidnogo kompleksa list'ev *Srataegus sanguinea* (rosaceae) iz flory respubliki Bashkortostan / S.R. Hasanova [i dr.] // *Rastitel'nye resursy.* – 2015. – Т. 51, № 3. – S. 397-406. [In Russ].
8. GOST R ISO 5725-2-2002 Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. CHast' 2. Osnovnoj metod opredeleniya povtoryaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmerenij. [In Russ].
9. Rukovodstvo dlya predpriyatij farmacevticheskoj promyshlennosti: metodicheskie rekomendacii / N.V. YUrgel' [i dr.] – М.: Izd-vo «Sport i kul'tura – 2000», 2007. – 192 s. [In Russ].