

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУКОИДАНА ИЗ ФУКУСА ПУЗЫРЧАТОГО

Е.Д. Облучинская^{1*}, кандидат фармацевтических наук,
В.М. Косман², кандидат фармацевтических наук,
О.Н. Пожарицкая², кандидат фармацевтических наук,
А.Н. Шиков², доктор фармацевтических наук

¹Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН;
Российская Федерация, 183010, Мурманск, ул. Владимирская, д. 17

²Санкт-Петербургский институт фармации; Российская Федерация, 188663,
Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, д. 6/н, корп. 245

Введение. Фукоиданы – сульфатированные гомо- и гетерополисахариды, синтезируемые клетками бурых водорослей разных видов. Фукоидан фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) перспективен для создания новых лекарственных препаратов антикоагулянтного действия [3].

Цель исследования – подбор условий пробоподготовки для количественного определения фукоидана в экстракте фукуса пузырчатого и валидация методики.

Материал и методы. В работе использована субстанция фукоидана, полученная из слоевищ фукуса пузырчатого. Исследование выполнялось спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Pharm Spec 1700 (Япония).

Результаты. Проведена валидация методики количественного определения фукоидана фукуса пузырчатого по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Заключение. По результатам проведенной процедуры валидации методики количественного определения фукоидана фукуса пузырчатого установлено, что методика воспроизводима и пригодна для дальнейшего использования.

Ключевые слова: фукоидан, фукус пузырчатый, *Fucus vesiculosus* L., спектрофотометрия, валидация.

*E-mail: okaterine@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Фукоиданы водорослей присутствуют в природных источниках в больших количествах и известны как весьма перспективные биологически активные биополимеры, практически лишенные токсических свойств [1, 2]. Наиболее подробно изучено их гепариноподобное (антикоагулянтное и антитромботическое) действие [3]. Фукоиданы – сульфатированные гомо- и гетерополисахариды, синтезируемые клетками бурых водорослей разных видов. Основной компонент – альфа-L-фукоза и сульфатные группы, в состав также могут входить D-галактоза, D-манноза, D-ксилоза, L-рамноза, остатки D-глюкуроновой кислоты, ацетильные группы [4].

Фукоидан фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) перспективен для создания новых лекарственных препаратов антикоагулянтного действия [3]. В Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра РАН разработана оригинальная технология комплексной переработки фукуса пузырчатого, произрастающего в Баренцевом море,

на одном из этапов которой получают экстракт с преимущественным содержанием фукоидана [5,6]. Стандартизация фукоидана – важная, но недостаточно изученная проблема. Содержание основного моносахарида фукоиданов – фукозы – зависит от вида водорослей, условий их произрастания, сезона сбора и других факторов. Существенное влияние на состав и свойства фукоиданов оказывает технология их выделения [4].

Для стандартизации субстанции в качестве основного количественного параметра, требующего дальнейшей валидации, предложено определение содержания фукоидана. В основе методики лежит спектрофотометрический метод, основанный на реакции фукозы с L-цистеином [7]. Метод считается специфичным и широко используется в анализе полисахаридов и фукоиданов [8]. Поскольку L-фукоза является основной 6-дезоксигексозой, присутствующей в бурых водорослях, наличие и содержание фукоидана может быть основано на определении этого моносахарида.

Цель данного исследования – подбор условий пробоподготовки для количественного определения фукоидана в экстракте фукуса пузырчатого и валида-

ция методики в соответствии с требованиями, предъявляемыми к методам стандартизации лекарственных препаратов [9].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе была использована субстанция фукоидана, полученная из слоевищ фукуса пузырчатого, предоставленная Мурманским морским биологическим институтом Кольского научного центра РАН.

Количественное определение фукоидана выполнено спектрофотометрическим методом [8] на спектрофотометре Pharma Spec 1700 (Япония). Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с требованиями [10] с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента методика оптимизирована для анализа стандартизуемой субстанции фукоидана. Так подобраны оптимальные концентрации раствора фукозы и испытуемого раствора, обеспечивающие получение значений оптических плотностей около 0,5 опт. ед. Кроме того, проверено время проведения реакции. Измерение оптической плотности продуктов реакции, согласно данным литературы, рекомендуется проводить через 2 ч от момента смешения реагентов [7, 8]. Для дальнейшего серийного анализа решено было проверить возможность сокращения затрат рабочего времени. Поэтому был выполнен специальный эксперимент, в ходе которого измерения оптических плотностей для нескольких растворов фукозы различной концентрации проводили на нескольких временных точках по мере протекания реакции. Концентрации растворов фукозы были подобраны таким образом, чтобы значения оптических плотностей находились на нижней границе диапазона – около 0,1–0,2 опт. ед. (0,0154 мг/мл), в середине – около 0,5–0,6 опт. ед. (0,0616 мг/мл) и на верхней границе – около 1,2–1,3 опт. ед. (0,154 мг/мл). Результаты (рис. 1) свидетельствовали о нарастании значений оптической плотности с течением времени, к 2 ч достигалось так называемое «плато». Таким образом, подтверждена необходимость выдерживания испытуемой смеси в течение 2 ч для более полного протекания реакции.

Валидация методики определения содержания фукоидана в субстанции выполнялась в соответствии с существующими рекомендациями [9]. Параметры валидации следующие: специфичность (Specificity), линейность (Linearity), прецизионность (Precision) на уровне сходимости (Repeatability) и точность или правильность (Accuracy).

Специфичность методики была показана сопоставлением УФ-спектров испытуемого раствора (после проведения реакции с L-цистеином), раствора стандартного образца фукозы и плацебо (рис. 2). Наличие специфических максимумов в УФ-спектрах продуктов реакции с L-цистеином испытуемого раствора и раствора фукозы, а также отсутствие максимумов в УФ-спектре продуктов реакции раствора плацебо свидетельствовало о специфичности предлагаемой методики.

Проверка линейности выполнялась на примере раствора фукозы. Выбор области концентраций зависит от предполагаемого использования методики, в частности для теста «Количественное определение» при определении фукоидана в субстанции из фукуса пузырчатого, требуемый диапазон – 80–120% от номинальной концентрации (соответствует концентрации фукозы от 0,048 до 0,072 мг/мл, номинальная концентрация раствора фукозы – 0,06 мг/мл – обеспечивает значение оптической плотности около 0,5 опт. ед.). График зависимости оптической плотности от концентрации раствора СО фукозы имел линейный характер (рис. 3).

Первичные данные переведены в нормализованные координаты (концентрации и оптические плот-

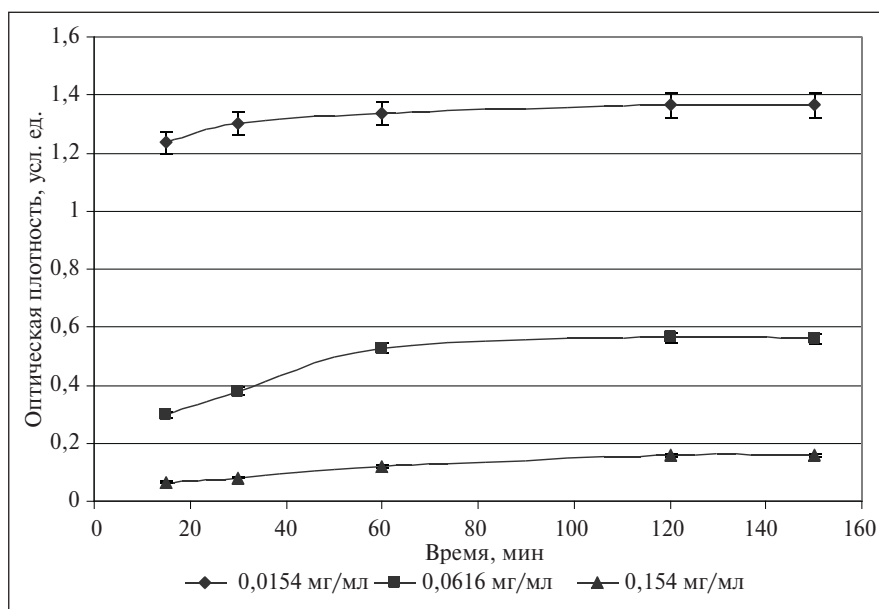


Рис. 1. Изменение оптической плотности продуктов реакции фукозы с цистеином в зависимости от времени протекания реакции для растворов фукозы различной концентрации

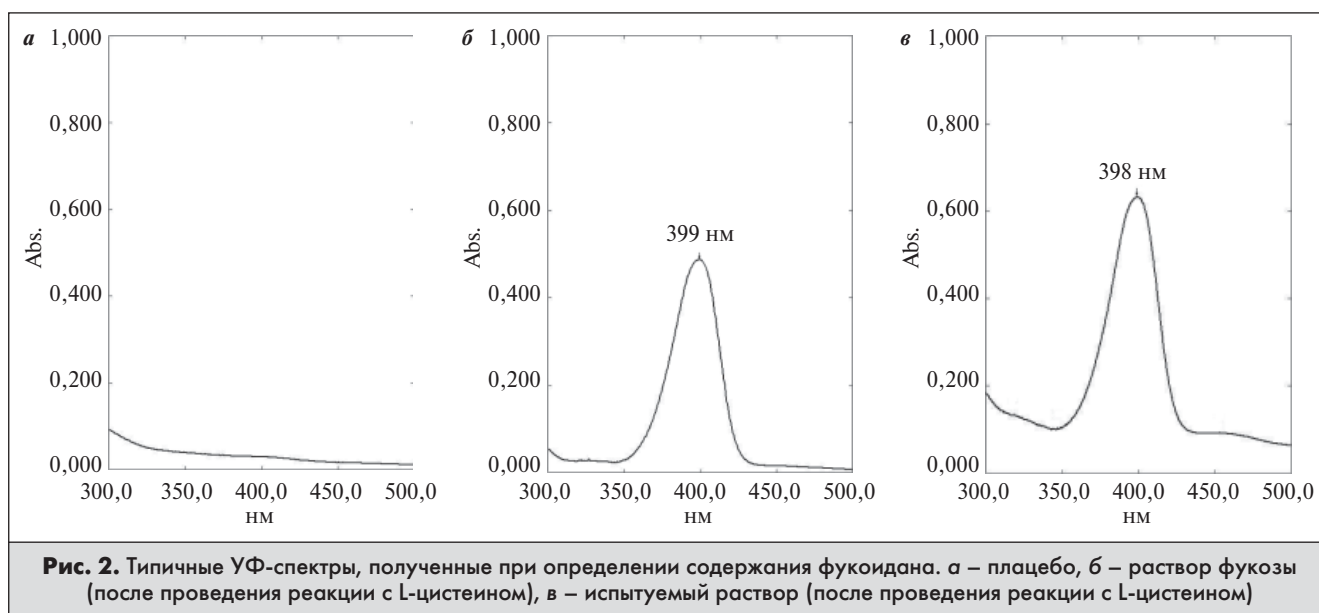


Рис. 2. Типичные УФ-спектры, полученные при определении содержания фукоидана. а – плацебо, б – раствор фукозы (после проведения реакции с L-цистеином), в – испытуемый раствор (после проведения реакции с L-цистеином)

ности, соответствующие 100% номинальной концентрации, приняты за 100%), получены уравнения регрессии и статистические параметры для нормализованных данных (табл. 1) и проведено их сравнение с рекомендуемыми [9].

Полученные значения статистических критериев удовлетворяют требованиям Руководства по валидации [9]. Следовательно, валидируемая методика может быть использована в тесте «Количественное определение».

Правильность оценивали по результатам анализа модельных растворов фукозы с концентра-

цией в диапазоне 80, 100 и 120% от номинальной (табл. 2).

В соответствии с требованиями [9] в тесте «Количественное определение» для субстанций при допустимом уровне отклонений в содержании действующих веществ $\pm 3\%$ значение систематической погрешности ($|\delta|$, %) не должно превышать 0,96. Полученное среднее значение (0,78%) согласуется с этими рекомендациями.

Прецизионность оценивали по результатам анализа фукозы. Образец анализировали в одних условиях в 6 повторностях в течение 3 различных дней.

По результатам измерений в 1 день судили о внутрисуточной прецизионности, по результатам всех измерений – о междневной прецизионности (табл. 3). Внутрисуточная прецизионность не превышала 1,3%; междневная прецизионность составляла 2,9%. В целом прецизионность валидируемой методики не превышала максимально допустимую неопределенность результата (Δ_{As} , 3,0%).

Таким образом, методика определения содержания фукоидана в субстанции фукоидана валидирована в соответствии с современными требованиями по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным параметрам.

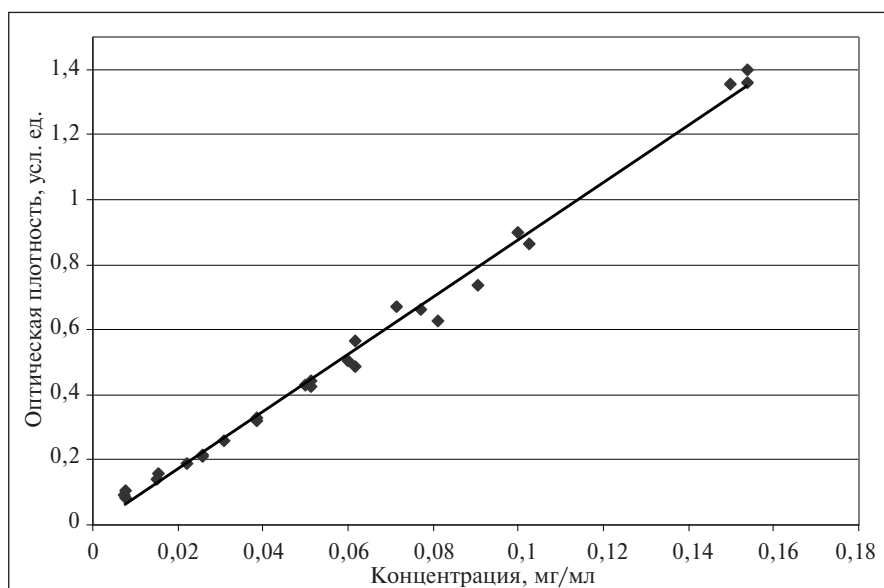


Рис. 3. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора СО фукозы в тесте «Количественное определение»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнена процедура валидации методики количественного определения фукоидана фукуса пузырчатого. Согласно результатам исследования, методика воспроизводима и пригодна для дальнейшего использования.

Исследования осуществлены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках реализации мероприятия 2.5 «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Li N., Zhang Q., Song J. Toxicological evaluation of fucoïdan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2005; 43 (3): 421–6.
2. Gideon T.P., Rengasamy R. Toxicological evaluation of fucoïdan from *Cladosiphon okamuranus*. *Journal of Medicinal Food*, 2008; 11 (4): 638–42.
3. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and anti-adhesive activities of nine different fucoïdanes from brown seaweeds. *Glycobiology*, 2007; 17 (5): 541–52.
4. Фукоиданы - сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства (под ред. Н. Н. Беседнова, Т. Н. Звягинцева). Владивосток, 2014; 379. (Fucoïdan - sulfated polysaccharides kelp. Structure, enzymatic transformation and biological properties (ed. by N.N. Besednova, T.N. Zvjaginseva). Vladivostok, 2014; 379) (in Russian).
5. Облучинская Е.Д. Метод получения сухого экстракта фукуса – основы для антикоагулянтной мази. Патент РФ 2506089; Б.И. 2014; 4. (Oblichinskaja E.D. Dry fucus extract, method for preparing it, and base anticoagulant ointment. Pat. RU 2506089 / Rrior. day 17.07.2012) (in Russian).
6. Облучинская Е.Д., Макарова М.Н., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н. Влияние ультразвуковой обработки на химический состав и антикоагулянтные свойства сухого экстракта фукуса. *Хим.-фарм. журн.*, 2015; 49 (3): 35–8. (Oblichinskaya E.D., Makarova M.N., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N. Effect of Ultrasonic Treatment on the Chemical Properties and Anticoagulant Activity of Fucus Dry Extract. *Pharm. Chem. J.*, 2015; 49 (3): 35–8) (in Russian).
7. Dische Z., Shettles L.B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *Journal of Biological Chemistry*, 1948; 175 (2): 595–603.
8. Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов. Вып. 3. Руководство по современным методам исследований морских водорослей, трав и продуктов их

Таблица 1

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ НОРМАЛИЗОВАННЫХ ДАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА РАСТВОРОВ СО ФУКОЗЫ

Параметр	Получено для растворов фукозы	Требования по [9]
Уравнение регрессии	$Y=1,0213X-1,9152$	
Диапазон концентраций, %	37–128	80–120
Значение остаточного стандартного отклонения (S_0), %	1,17	1,58
Значение коэффициента корреляции (r)	0,9992	0,9933
Значение свободного члена в уравнении регрессии (a), %	1,9	4,8

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФУКОИДАНА

Внесено фукозы, мг/мл	Концентрация, % от номинальной	Найдено фукозы, мг/мл	Погрешность абс., мг/мл	Погрешность отн., %
0,0480	80,0	0,0477	-0,0003	-0,55
		0,0483	0,0003	0,63
		0,0473	-0,0007	-1,50
0,0580	96,7	0,0582	0,0002	0,29
		0,0571	-0,009	-1,47
		0,0578	-0,0002	-0,30
0,0710	118,3	0,0705	-0,0005	-0,66
		0,0701	-0,0009	-1,30
		0,0708	-0,0002	-0,34
			Среднее	0,78

Таблица 3

ОЦЕНКА ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФУКОИДАНА В СУБСТАНЦИИ ИЗ ФУКУСА ПУЗЫРЧАТОГО

Концентрация от номинальной, %	Внутридневная прецизионность (intra-day precision), RSD, %	Междневная прецизионность (inter-day precision), RSD, %
80	1,1	2,1
100	1,3	2,9
120	1,0	1,2

переработки. М.: ВНИРО, 2009; 108. (Quality, safety and methods of analysis of the products of aquatic organisms. Vol. 3. Guidance on modern methods of research of algae, herbs and their products. Moscow: VNIRO, 2009; 108) (in Russian).

9. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007; 49. (Guidelines for the validation of drugs analysis techniques. Moscow: Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 2007; 49) (in Russian).

10. Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып. 1, 2. М.: Медицина, 1987; 335; 1989, 398. (The State Pharmacopoeia of the USSR, the XI-th ed., vol. 1, 2. Moscow: Meditcina, 1987; 335; 1989, 398) (in Russian).

Поступила 22 января 2016 г.

VALIDATION OF A PROCEDURE FOR ASSAY OF FUCOIDAN FROM BLADDERWRACK (*FUCUS VESICULOSUS*)

E.D. Obluchinskaya¹, PhD; V.M. Kosman², PhD; O.N. Pozharitskaya², PhD; A.N. Shikov², PhD

1Murmansk Marine Biological Institute, Kola Research Centre, Russian Academy of Sciences;

¹7, Vladimirskaia St., Murmansk 183010, Russian Federation

²Saint Petersburg Institute of Pharmacy; Build. 245, Kuzmolovsky Urban-Type Community, Vsevolozhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation

SUMMARY

Background. Fucoidans are sulfated homo- and heteropolysaccharides synthesized by the cells of brown algae (Phaeophyta) of different species. Fucoidan extracted from bladderwrack (*Fucus vesiculosus* L.) is promising for designing novel anticoagulants (3).

Objective: to choose conditions for preparing samples to quantify fucoidan in the bladderwrack extract and to validate the procedure.

Materials and methods. The investigation used fucoidan substance extracted from bladderwrack thallus. This was performed by spectrophotometry using a Pharma Spec 1700 spectrophotometer (Japan).

Results. The procedure for quantification of fucoidan from bladderwrack was validated by the indicators: specificity, linearity, correctness, and precision.

Conclusion. The validation of the procedure for assay of bladderwrack fucoidan has established that this is reproducible and suitable for further application.

Key words: fucoidan, bladderwrack, *Fucus vesiculosus* L., spectrophotometry, validation.