

СКВОЗНАЯ СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУБСТАНЦИИ ФУКОИДАНА И ПРЕПАРАТОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ

В.М. Косман^{1*}, кандидат фармацевтических наук,
Е.Д. Облучинская², кандидат фармацевтических наук,
О.Н. Пожарицкая¹, кандидат фармацевтических наук,
М.Н. Макарова¹, доктор медицинских наук,
А.Н. Шиков¹, доктор фармацевтических наук

¹Санкт-Петербургский институт фармации; Российская Федерация, 188663,
Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245;

²Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН;
Российская Федерация, 183010, Мурманск, ул. Владимирская, д. 17

Введение. Фукоиданы сочетают в себе свойства антикоагулянтов, ингибиторов тромбина и фибринолитиков. Они перспективны для клинического использования и являются альтернативой гепарину. При разработке методик контроля качества лекарственных препаратов растительного происхождения необходимо следовать принципам сквозной стандартизации.

Цель работы – разработка и валидация методик стандартизации фармацевтической субстанции фукоидана и готовых лекарственных форм на ее основе (мази, таблеток) с соблюдением принципов сквозной стандартизации.

Материал и методы. Фукоидан выделен в Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра РАН, опытные партии фукоидана в форме мази и таблеток разработаны и получены в Санкт-Петербургском институте фармации.

Результаты. Количественное содержание фукоидана положено в основу сквозной стандартизации субстанции и готовых лекарственных форм (ЛФ). Определение содержания фукоидана спектрофотометрическим методом основано на реакции фукозы с L-цистеином. Основное отличие анализа лекарственной формы (ЛФ) от анализа соответствующей субстанции заключается в выборе оптимальной процедуры подготовки проб. Методики определения содержания фукоидана в ЛФ, а также в среде растворения валидированы. Методика линейна в диапазоне 0,0077–0,077 мг/мл фукозы, систематическая ошибка – менее 0,5%, внутрисуточная прецизионность – 1,3–1,5%, междневная прецизионность – 1,5–2,9%.

Заключение. Разработанную методику рекомендуется применять как для анализа субстанции, так и для лекарственных форм, что позволит обеспечить соблюдение принципа сквозной стандартизации.

Ключевые слова: фукоидан, фукус пузырчатый, *Fucus vesiculosus* L., сквозная стандартизация, мазь, таблетки, спектрофотометрия, валидация

E-mail: spbpharm@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Сульфатированные полисахариды из фукусовых водорослей – фукоиданы – сочетают в себе свойства антикоагулянтов, ингибиторов тромбина и фибринолитиков [1, 2]. Они перспективны для клинического использования и могут быть реальной альтернативой гепарину, имеющему ряд недостатков. Оригинальная технология переработки фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) Баренцева моря с получением экстракта, обогащенного фукоиданом, создана в Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра РАН [3]. Субстанция фукоидана предложена в качестве фармацевтической субстанции (ФС) для создания препаратов антикоагулянтного действия в виде готовых лекарственных форм (ЛФ) для внутреннего (таблетки) и наружного (мазь) применения.

Создание антикоагулянтных препаратов местного действия для лечения варикозной болезни, рассасывания гематом и других представляет особый интерес, так как при накожном нанесении действующее вещество в высокой концентрации попадает непосредственно на участок, где требуется воздействие лекарственного средства (ЛС), при этом риск развития нежелательных побочных эффектов минимален. Вопросы стандартизации и контроля качества лекарственных растительных препаратов (ЛРП), производимых в России, весьма актуальны. При разработке методик контроля качества суммарных ЛРП необходимо следовать принципам сквозной стандартизации [4–6].

Согласно общепризнанной концепции сквозной стандартизации, разработанной для растительного сырья и фитопрепаратов, основным направлением является разработка универсальных методик, позволяющих контролировать содержание действующего

ющей группы биологически активных веществ (БАВ) в сырье и его лекарственных формах (ЛФ) [3]. При этом установление содержания одной и той же группы БАВ в сырье и препаратах должно проводиться с использованием одного и того же метода. Поэтому целесообразно применять одни и те же методики обнаружения и количественного определения БАВ в растительном сырье и экстрактах, полученных из ЛРС, а затем и в других ЛФ из этих экстрактов. Подобный принцип реализован, например, при стандартизации препаратов из листьев малины, травы пустырника [5, 6].

Стандартизация субстанции и ГЛФ фукоидана – важный элемент доклинических исследований и может быть основана на оценке содержания фукоидана, сульфатов и составе моносахаридов как параметров, значимых для проявления антикоагулянтных свойств [1].

Цель работы – разработка и валидация методик стандартизации ФС фукоидана и ГЛФ на ее основе в форме мази и таблеток с соблюдением принципов сквозной стандартизации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы субстанция фукоидана, полученная из слоевищ фукуса пузырчатого (предоставлена Мурманским морским биологическим институтом КНЦ РАН) и опытные партии ГЛФ фукоидана (мазь и таблетки), разработанные и полученные в Санкт-Петербургском институте фармации.

Количественное определение фукоидана выполнено спектрофотометрическим методом, содержание сульфатов определяли турбидиметрическим методом [7] с использованием спектрофотометра Pharma Spec 1700 (Япония).

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII издания (ГФ РФ XIII) [8] с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субстанция фукоидана представляет собой порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, растворимый в воде. На основании результатов анализа нескольких серий субстанции на содержание фукоидана и сульфатов установлено, что фукоидан доминирует в составе субстанции. Поэтому содержание фукоидана положено в основу сквозной стандартизации субстанции и ГЛФ фукоидана.

Определение содержания фукоидана спектрофотометрическим методом основано на реакции фукозы с L-цистеином, которую считают специфичной и широко применяют в анализе полисахаридов и фукоиданов [1, 7]. Методика количе-

ственного определения фукоидана была успешно применена и валидирована ранее для анализа ФС фукоидана [9]. В ходе настоящего исследования методика оптимизирована для анализа фукоидана в средах высвобождения для биофармацевтической оценки ГЛФ фукоидана, а также для качественной и количественной стандартизации действующего вещества ГЛФ фукоидана в форме мази и в форме таблеток.

Основное отличие анализа ЛФ от анализа соответствующей субстанции заключается в выборе оптимальной процедуры пробоподготовки, позволяющей устранить возможное мешающее влияние вспомогательных веществ и выделить анализируемое соединение в форме пригодной для дальнейшего анализа.

При разработке методики анализа фукоидана в ЛФ в виде мази были проверены варианты пробоподготовки, включающие растворение навески мази в воде очищенной без каких-либо воздействий, а также при вортексировании, обработке в УЗ-ванне, нагревании при температуре 40–45°C и одновременной обработке в УЗ-ванне и нагревании. При разработке методики анализа фукоидана в ЛФ в виде таблеток были проверены варианты пробоподготовки, включающие обработку порошка растертых таблеток водой очищенной в различных условиях: при интенсивном встряхивании; при вортексировании; при обработке в УЗ-ванне; нагревании до температуры 40–45°C; при обработке в УЗ-ванне и нагревании. Эксперименты выполнены с модельными смесями мази и таблеток с содержанием фукоидана 110,8 и 263,4 мг/г соответственно. Эффективность процедуры подготовки проб оценивали по принципу «внесено-найдено».

Согласно полученным данным (табл. 1), все рассмотренные варианты пробоподготовки позволяют достаточно полно определить внесенное количество фукоидана – относительная погрешность не превышала 1,5%. Однако самый простой и самый быстрый вариант – обработка навески водой очищенной – необходимый и достаточный этап для подготовки проб мази и таблеток к последующему анализу фукоидана. Применение дополнительных воздействий – вортексирования, ультразвуковой обработки, температурного воздействия – не приводит к значительному улучшению результатов по количественному анализу фукоидана в ГЛФ.

При разработке методик анализа ГЛФ фукоидана выбран оптимальный тип фильтрующего материала (фильтр-насадки с диаметром пор 0,45 мкм), подобраны концентрации испытуемых растворов, вносимых в реакцию с L-цистеином, обеспечивающие в дальнейшем получение значений оптических плотностей около 0,5 опт. ед., а также установлено отсутствие мешающего влияния ком-

**РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОЙ ПРОЦЕДУРЫ
ПРОБОПОДГОТОВКИ МАЗИ И ТАБЛЕТОК ФУКОИДАНА**

Процедура пробоподготовки	Найдено фукоидана, мг/г	Погрешность абс., мг/г	Погрешность отн., %
<i>Мазь, внесено фукоидана 110,8 мг/г</i>			
Растворение навески мази в воде очищенной	111,2±1,0	0,4	54
Растворение навески мази в воде очищенной при вортексировании	111,4±1,2	0,6	0,72
Растворение навески мази в воде очищенной при обработке в УЗ-ванне	110,0±1,3	0,8	0,7
Растворение навески мази в воде очищенной при нагревании до температуры 40–45°С	112,2±1,3	1,4	1,26
Растворение навески мази в воде очищенной при обработке в УЗ-ванне и нагревании при температуре 40–45°С	109,9±0,3	0,9	0,81
<i>Таблетки, внесено фукоидана 263,4 мг/г</i>			
Встряхивание	262,1±1,2	1,3	0,49
Интенсивное перемешивание	261,3±1,1	2,1	0,91
Обработка в УЗ-ванне	265,2±1,4	1,8	0,68
Нагревание при температуре 40–45°С	266,0±1,3	2,6	0,99
Обработка в УЗ-ванне и нагревание при температуре 40–45°С	260,5±1,5	2,5	0,95

понентов вспомогательных веществ (плацебо) на результаты спектрофотометрического определения для 2 видов ГЛФ.

По результатам анализа модельных смесей мазей с добавками фукоидана было определено от 99,10 до 101,26% от внесенного количества, по результатам анализа модельных смесей таблеток – от 99,24 до 100,95% от внесенного количества. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки определения.

Методики определения содержания фукоидана в ГЛФ в форме мази и в форме таблеток, а также в среде растворения валидированы в соответствии с существующими требованиями [10] по показателям специфичность, линейность, прецизионность

(на уровне повторяемости или сходимости) и правильность.

Специфичность методики подтверждена сопоставлением УФ-спектров испытуемого раствора (после проведения реакции с L-цистеином), раствора стандартного образца фукозы и плацебо. Вид УФ-спектров аналогичен приведенным ранее [9]. Наличие специфических максимумов в УФ-спектрах продуктов реакции с L-цистеином испытуемых растворов и раствора фукозы, а также отсутствие максимумов в УФ-спектре продуктов реакции растворов плацебо свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

Линейность оценивали по результатам анализа растворов стандартного образца (СО) фуко-

Таблица 2

**СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ НОРМАЛИЗОВАННЫХ ДАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ
АНАЛИЗА РАСТВОРОВ СО ФУКОЗЫ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК АНАЛИЗА ГЛФ ФУКОИДАНА**

Параметр	Получено для растворов СО фукозы для анализа ГЛФ	Требования для ГЛФ при допустимом отклонении ±5%	Получено для растворов СО фукозы для теста «Растворение»	Требования для теста «Растворение»
Уравнение регрессии	$Y=1,023X-1,6819$		$Y=0,9928X+0,9425$	
Диапазон концентраций, %	36,7–128,0	80–120	12,8–128,0	±20% от величины высвобождения
Значение остаточного стандартного отклонения (S_0), %	0,76	0,84	1,41	1,56
Значение коэффициента корреляции (r)	0,9997	0,9981	0,9991	0,9984
Значение свободного члена в уравнении регрессии (a), %	1,7	2,6	0,9	2,1

Таблица 3

ДАнные ПРОВЕРКИ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ МАЗИ И ТАБЛЕТОК

Внесено фукоидана, мг/г	Навеска, % от номинальной	Найдено фукоидана, мг/г	Погрешность абс., мг/г	Погрешность отн., %
<i>Мазь</i>				
110,8	80	110,4	-0,4	-0,36
		109,9	-0,9	-0,81
		111,0	+0,2	0,18
	100	109,8	-1,0	-0,90
		112,2	+1,4	1,26
		110,0	0,0	0,00
	120	110,6	-0,2	-0,18
		110,9	+0,1	0,09
		110,3	+0,5	0,45
Среднее				0,47
<i>Таблетки</i>				
263,4	80	265,9	+2,5	+0,95
		262,7	-0,7	+0,27
		264,2	+1,0	+0,38
	100	265,0	+2,0	+0,76
		264,6	+1,2	+0,46
		261,5	-2,0	-0,76
	120	261,7	-1,7	-0,65
		263,8	+0,4	+0,15
		263,7	+0,3	+0,11
Среднее				0,50

зы в диапазоне концентраций 80–120% от номинальной концентрации (соответствует концентрации фукозы от 0,048 до 0,072 мг/мл) для анализа ГЛФ. Для методик, применяемых для теста «Растворение», требуемый диапазон $\pm 20\%$ от величин высвобождения [10] или 50–120% от ожидаемой концентрации действующего вещества в среде растворения. Поскольку методику предполагалось использовать для разработки теста и сравнительной оценки различных составов мазей и таблеток, был выбран максимальный диапазон, соответствующий концентрации СО фукозы от 0,0077 до 0,077 мг/мл. Первичные данные переведены в нормализованные координаты, получены уравнения регрессии и статистические параметры для нормализованных данных (табл. 2).

По результатам сравнения полученных статистических критериев валидируемые методики могут быть использованы в тестах «Количественное определение» и «Растворение». Правильность оценивали по результатам анализа модельных растворов с концентрациями СО около 80, 100 и 120% от номинальной и модельных смесей мази с содержанием фукоидана 110,8 мг/г и таблеток с содержанием фукоидана 263,4 мг/г, варьируя навески для приготовления испытуемого раствора в диапазоне 80, 100 и 120% от номинальной. Результаты анализа модельных растворов аналогичны данным, полученным ранее [9].

В тесте «Количественное определение» для ГЛФ при допустимом уровне отклонений в содержании действующих веществ $\pm 5\%$ значение систематической погрешности ($|\delta|$, %) не должно превышать 0,51, для теста «Растворение» – 0,95. Полученные средние значения (0,47 и 0,50%) удовлетворяют этим рекомендациям (табл. 3).

Прецизионность на уровне повторяемости (сходимости) оценивали по результатам анализа раствора СО фукозы. Образец анализировали в одних и тех же условиях в 6 повторностях в течение 3 разных дней. По результатам измерений 1-го дня судили о внутридневной прецизионности, по результатам всех измерений – о междневной прецизионности. Преци-

зионность методик при анализе ГЛФ не превышала максимально допустимую неопределенность результата ($\max \Delta_{AS}$), которая составила 1,6%: внутридневная прецизионность (intra-day precision) не превышала 1,3%, а междневная прецизионность (inter-day precision) – 1,5%. В случае теста «Растворение» внутридневная прецизионность (intra-day precision) не превышала 1,5%; междневная прецизионность (inter-day precision), 2,9%, что в целом не превышало максимально допустимую неопределенность результата (Δ_{AS} , 2,96%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методика, основанная на спектрофотометрическом определении продуктов реакции фукозы с L-цистеином, применима для анализа фукоидана не только в субстанции, но и в лекарственных формах в виде мази и таблеток. Применение аналогичной методики для анализа, как субстанции, так и для лекарственных форм позволяет обеспечить соблюдение принципа сквозной стандартизации.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 14.N08.11.1036 «Доклинические исследования антикоагулянтного лекарственного средства на основе фукоидана», шифр 2015-14-N08-0036.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А.И., Билан М.И. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Успехи химии, 2009; 78 (8): 846–62.
2. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpinić S.S. Therapies from fucoidan: An update. *Marine drugs*, 2015; 13 (9): 5920–46.
3. Облучинская Е.Д., Макарова М.Н., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н. Влияние ультразвуковой обработки на химический состав и антикоагулянтные свойства сухого экстракта фукуса. *Химико-фармацевтический журнал*, 2015; 49 (3): 35–8.
4. Марахова А.И. Методологические аспекты разработки методик количественного анализа на химический состав и антикоагулянтные свойства сухого экстракта фукуса. *Химико-фармацевтический журнал*, 2015; 49 (3): 35–8.
5. Самылина И.А., Сокольская Т.А., Давыдова В.Н., Казначеева Е.В. Разработка методов сквозной стандартизации количественного определения суммы флавоноидов в листе малины и в сухом экстракте листа малины. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2011; 5: 4–5.
6. Марахова А.И., Сорокина А.А., Станишевский Я.М. Применение принципа сквозной стандартизации в анализе флавоноидов травы пустырника и препаратов на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 2016; 1 (14): 150–4.
7. Имбс Т.И., Харламенко В.И., Звягинцева Т.Н. Оптимизация процесса экстракции фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. *Химия растительного сырья*, 2012; 1: 143–47.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд., том 1. М.: МЗ РФ, 2015; 1470.
9. Облучинская Е.Д., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н. Валидация методики количественного определения фукоидана из фукуса пузырчатого. *Фармация*, 2016; 65 (4): 26–30.
10. Руководство по валидации методики анализа лекарственных средств. М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007; 49.

Поступила 15 мая 2017 г.

THROUGH STANDARDIZATION OF THE SUBSTANCE FUCOIDAN AND ITS BASED PREPARATIONS

V.M. Kosman¹, PhD; E.D. Obluchinskaya², PhD; O.N. Pozharitskaya¹, PhD; M.N. Makarova¹, MD; A.N. Shikov¹, PhD

¹Saint Petersburg Institute of Pharmacy; 3, Zavodskaya St., Build. 245, Urban-Type Community, Vsevolzhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation;

²Murmansk Marine Biological Institute, Kola Research Centre, Russian Academy of Sciences; 17, Vladimirskaia St., Murmansk 183010, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Fucoidans combine the properties of anticoagulants, thrombin inhibitors, and fibrinolytic drugs. They are promising for clinical use and are an alternative to heparin. When procedures are developed for quality control of herbal medicines, it is necessary to follow the principles of through standardization.

Objective: to develop and validate standardization procedures for the pharmaceutical substance fucoidan and its based ready-made formulations (RMF) (ointments, tablets), by complying with the principles of through standardization.

Material and methods. Fucoidan was isolated at the Murmansk Marine Biological Institute, Kola Research Center, Russian Academy of Sciences; experimental batches of fucoidan as ointments and tablets were designed and prepared at the Saint Petersburg Institute of Pharmacy.

Results. The quantitative content of fucoidan forms the basis for the through standardization of its substance and RMFs. The content of fucoidan was determined by a spectrophotometric method based on the reaction of fucose with L-cysteine. The main difference between the analysis of a formulation and that of the relevant substance is to select an optimal procedure for sample preparation. The procedures were validated for the determination of the content of fucoidan in RMF and in the dissolution medium. The procedure is within the linear range of 0.0077–0.077 mg/ml of fucose; the systematic error is less than 0.5%; the intraday and interday precision is 1.3–1.5 and 1.5–2.9%, respectively.

Conclusion. The developed procedure is recommended for both the analysis of the substance and formulations, which will be able to ensure compliance with the principle of through standardization.

Key words: fucoidan, bladder wrack, *Fucus vesiculosus* L., through standardization, ointment, tablets, spectrophotometry, validation.

REFERENCES

1. Usov A.I., Bilan, M.I. Fucoidans – sulfated polysaccharides of brown algae. *Uspekhii himii*, 2009; 78 (8): 846–62 (in Russian).
2. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpinić S.S. Therapies from fucoidan: An update. *Marine drugs*, 2015; 13 (9): 5920–46.
3. Obluchinskaya 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. *Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal*, 2015; 49 (3): 35–8 (in Russian).
4. Marakhova A.I. Methodological aspects of development of techniques of quantitative analysis in the standardization of medicinal plants. *Uspekhii sovremennogo estestvoznaniya*, 2015; 11(1): 58–61 (in Russian).
5. Samylina I.A., Sokol'skaja T.A., Davydova V.N., Kaznacheeva E.V. Development of methods through standardization of the quantitative determination of the amount of flavonoids in raspberry leaf and dry leaf extract of raspberry. *Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmaceuticheskoi himii*, 2011; 5: 4–5 (in Russian).
6. Marakhova A.I., Sorokina A.A., Stanishevskij Ja.M. Application of through standardization principle in the analysis of flavonoids motherwort herb and its preparation. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. 2016; 1 (14): 150–4 (in Russian).
7. Imbs T.I., Harlamenko V.I., Zvyagintseva T.N. Optimization of the extraction of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens*. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2012; 1: 143–7 (in Russian).
8. The State Pharmacopoeia of Russian Federation, the 13-th edition. Vol. 1. Moscow, 2015; 1470 (in Russian).
9. Obluchinskaya E.D., Kosman V.M., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N. Validation of a procedure for assay of fucoidan from bladderwrack (*Fucus vesiculosus*). *Farmatsiya*, 2016; 65 (4): 26–30 (in Russian).
10. Guidelines for the validation of drugs analysis techniques. Moscow: Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 2007; 49 (in Russian).