

УДК 615.074

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРПИСТЕНА В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

Е.И. Молохова<sup>1\*</sup>, Д.Е. Липин<sup>2</sup>, Р.В. Кириллова<sup>1</sup>

**Резюме.** Представлены результаты валидации аналитической методики количественного определения серпистена в мази методом УФ-спектрометрии. Методика валидирована по таким показателям, как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность.

**Ключевые слова:** валидация, количественное определение, мазь, серпистен, УФ-спектрометрия.

### VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF ASSAY OF SERPISTEN IN OINTMENT

E.I. Molokhova<sup>1\*</sup>, D.E. Lipin<sup>2</sup>, R.V. Kirillova<sup>1</sup>

**Abstract.** In this work are presented the results of analytical method validation of potency assay of serpisten in ointment according to the UF-spectrometry method. A method is validated on such indicators as specificity, range, linearity, trueness and a precision.

**Keywords:** validation, potency assay, ointment, serpisten, UF-spectrometry method.

1 – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 101

2 – ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», 623850, Россия, Свердловская область, г. Ирбит, ул. Кирова, 172

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 101, Ekaterininskaya str., Perm, 614990, Russia

2 – Joint Stock Company «Irbit Chemical and Pharmaceutical Plant», 172, Kirova str., Irbit, Sverdlovsk region, 623850, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: profmol17@gmail.com  
Тел.: 8 (912) 582 84 42

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из интенсивно исследуемых классов биологически активных веществ растений являются аналоги гормона линьки насекомых – фитоэкдистероиды – благодаря своему широкому спектру фармакологического действия, высокой активности и отсутствию токсического действия [1]. В результате многолетних исследований ученые Института биологии Коми научного центра Российской Академии наук интродуцировали растение *Serratula coronata* L. (серпуха венценосная), которое накапливает в условиях северных широт около 2% фитоэкдистероидов (в пересчете на сухое сырье), а также запатентовали технологию выделения из сырья фитоэкдистероидной фракции под названием серпистен, содержащей не менее 75% 20-гидроксиэкдизона и не менее 10% 25S-инокостерона [2].

Установлено, что фитоэкдистероиды обладают противовоспалительным [3] и противомикробным действием [4], а также влияют на дифференциацию кератиноцитов человека *in vitro* [3], что дает основание полагать наличие у них репаративных свойств. Известны составы мазей на основе фитоэкдистероидов, получаемых, в частности, из растений родов *Silene* и *Ajuga*. Однако в то же время в доступных источниках практи-

чески отсутствует информация о методах стандартизации мягких лекарственных форм (МЛФ) с экдистероидами, что делает актуальной разработку методики стандартизации мягких лекарственных форм, содержащих в качестве действующего вещества серпистен. Ранее нами показана возможность определения серпистена в мягкой лекарственной форме спектрофотометрическим методом [5]. Для доказательства достоверности и воспроизводимости результатов анализа проведена процедура валидации методик подлинности и количественного определения серпистена в мази, рекомендуемых для включения в проект нормативной документации.

Целью данной работы явилось изучение пригодности предлагаемой аналитической методики для стандартизации мази серпистена по показателям «подлинность» и «количественное содержание», а также проведение валидации по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы: субстанция серпистен (ТУ 1115-017-38576-2003, ООО «Комибиофарм»), Aerosil®200 (Evonik Industries AG, Герма-

ния), вазелин (ФСП 42-0526-5201-04, ООО «НПО «Ликом»), масло вазелиновое (ЛСР-007829/08-061008, АО «Медхим»), эмульгатор Т2 (ТУ 9145-005-54402189-02, ЗАО «Ласкрафт»), спирт этиловый 95% (ФС 001331-260216, ООО «Нижефарм»), вода очищенная (ФС 2.2.0020.15).

Приборы и аппаратура: весы прецизионные лабораторные ВМ153М- II (ООО «ОКБ Веста») спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр»), СФ-103 (ЗАО «НПКФ Аквилон»).

Методика количественного определения: в химический стакан помещали около 2,0 г (точная навеска) мази, добавляли около 15 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 10 мин. Надосадочную жидкость декантировали и помещали в морозильную камеру на 15 мин. К осадку добавляли около 10 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 5 мин. Затем химический стакан с раствором мази помещали в морозильную камеру на 15 мин. Перед определением оптической плотности обе вытяжки фильтровали через один мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вытяжки объединяли и доводили объем до 25 мл водой очищенной. На спектрофотометре снимали показания оптической плотности испытуемого раствора при длине волны 250 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Для снижения случайных и систематических ошибок при анализе серпистена в мази использовали метод расчета при помощи рабочего стандартного образца (РСО) серпистена, полученного от ООО «Комбибиофарм». Валидацию количественного определения проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [6] по следующим характеристикам: специфичность (specificity); аналитическая область (range); линейность (linearity); правильность (trueness); прецизионность (precision).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения специфичности проводили анализ образцов водных растворов серпистена в диапазоне концентраций 5–100 мкг/мл с учетом малой растворимости субстанции в воде (1 г в 500 мл воды). При изучении спектров поглощения водных растворов серпистена, представленных на рисунке 1, установлен максимум поглощения при  $250 \pm 2$  нм, который использован в качестве аналитической длины волны. Рабочей концентрацией раствора серпистена выбрали концентрацию 20–25 мкг/мл, при которой значение оптической плотности укладывается в рекомендуемые интервалы [7].

Специфичность методики теста «подлинность» определяли сравнительным анализом модельного состава основы мази, мази серпистена и водного раствора серпистена. Критерием приемлемости слу-

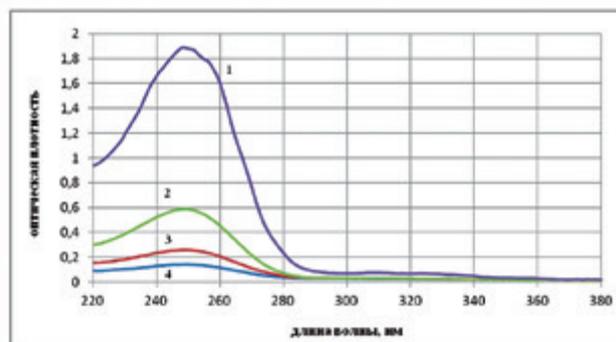


Рисунок 1. Спектр поглощения водных растворов серпистена:

1 – содержание серпистена 100 мкг/мл; 2 – содержание серпистена 25 мкг/мл; 3 – содержание серпистена 10 мкг/мл; 4 – содержание серпистена 5 мкг/мл

жило отсутствие у раствора основы мази максимума поглощения серпистена, одинаковое значение максимума поглощения водного извлечения мази и водного раствора серпистена, относительная погрешность единичного результата ( $\epsilon$ ) менее 5%. Полученные результаты отражены в таблице 1. Из таблицы 1 видно, что компоненты основы не мешают открытию серпистена из водного извлечения мази. Водное извлечение мази серпистена (рисунок 2) и водный раствор серпистена имеют максимум поглощения при 250 нм, относительную погрешность единичного результата 0,27% и 0,14% соответственно, что позволяет говорить о специфичности доказательства подлинности серпистена в мази спектрофотометрическим методом.

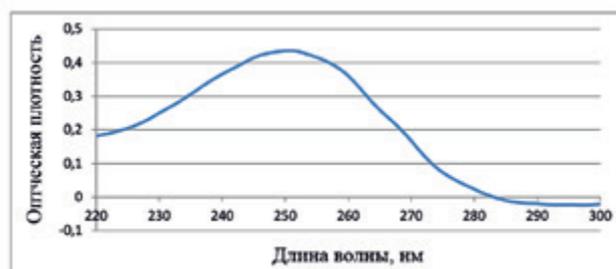


Рисунок 2. Спектр поглощения водного раствора мази серпистена

При изучении специфичность методики «количественное содержание» спектрофотометрическим методом критерием приемлемости служило отсутствие у раствора основы мази максимума поглощения серпистена, одинаковое количество обнаруженного серпистена в водном извлечении и водном растворе серпистена, относительная погрешность единичного результата ( $\epsilon$ ) менее 5%. По результатам экспериментальных данных, представленных в таблице 2, установлено отсутствие серпистена в основе мази, доказано, что отрываемость серпистена в водном извлечении из мази соответствует содержанию серпистена в водном растворе.

Таблица 1.

Результаты оценки специфичности спектрофотометрического метода в испытании «подлинность»

Наименование пробы	Максимум поглощения, нм	Метрологические характеристики
Водное извлечение основы мази	Отсутствует	
	Отсутствует	
Водное извлечение мази	249,6	$\bar{X}=249,92; S^2=0,057;$ $S=0,239; S_x=0,107;$ $RSD=0,10\%;$ $t(95\%, 4)=2,78; \Delta\bar{x}=\pm 0,30;$ $\epsilon=0,27\%$
	249,8	
	250,1	
	249,9	
	250,2	
Водный раствор серпистена	249,8	$\bar{X}=249,92; S^2=0,017;$ $S=0,130; S_x=0,058;$ $RSD=0,05\%;$ $t(95\%, 4)=2,78; \Delta\bar{x}=0,16;$ $\epsilon=0,14\%$
	250,0	
	249,9	
	249,8	
	250,1	

**Примечание:**  $\bar{X}$  – среднее значение выборки;  $S^2$  – дисперсия;  $S$  – стандартное отклонение;  $S_x$  – стандартное отклонение среднего результата;  $RSD$  – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации);  $\Delta\bar{x}$  – значение доверительного интервала среднего результата определения;  $\epsilon$  – относительная ошибка результата отдельного определения.

При определении линейности методики проводили анализ 5 растворов РСО серпистина с концентрациями от 5 до 25 мкг/мл. По полученным значениям построен калибровочный график, выражающийся уравнением  $Y=219X+0,0175$  ( $r=0,997$ ) и приведенный на рисунке 3.

Отклонение концентраций калибровочных растворов (80, 100, 120%), рассчитанных по уравнению ли-

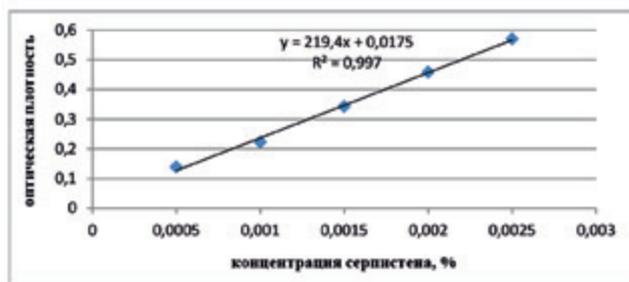


Рисунок 3. График зависимости оптической плотности серпистена от концентрации

нейной зависимости, от фактических значений приведены в таблице 2.

Установлено, что в пределах аналитической области определения серпистена наблюдается линейная зависимость определяемой величины, при этом полученные отклонения соответствовали нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Таблица 2.

Результаты оценки специфичности спектрофотометрического метода в испытании «количественное содержание»

Наименование пробы	Обнаружено серпистена, мг/г	Метрологические характеристики
Водное извлечение основы мази	Не обнаружено	
	Не обнаружено	
Водное извлечение мази	0,196	$\bar{X}=0,200; S^2=1,23 \times 10^{-5};$ $S=3,51 \times 10^{-3}; S_x=1,57 \times 10^{-3};$ $RSD=0,79\%;$ $t(95\%, 4)=2,78; \Delta\bar{x}=0,004;$ $\epsilon=4,87\%; \bar{\epsilon}=2,18\%$
	0,201	
	0,198	
	0,202	
	0,205	
Водный раствор серпистена	0,199	$\bar{X}=0,200; S^2=5,00 \times 10^{-6};$ $S=2,24 \times 10^{-3}; S_x=1,00 \times 10^{-3};$ $RSD=0,56\%;$ $t(95\%, 4)=2,78; \Delta\bar{x}=0,003;$ $\epsilon=3,11\%; \bar{\epsilon}=1,39\%$
	0,197	
	0,203	
	0,201	
	0,200	

Правильность методики устанавливали на идентичных образцах мази серпистена с добавлением известного количества РСО серпистена. Проводили по три испытания образца на трёх разных уровнях (навесках мази). Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, средняя величина которого должна находиться в пределах 95–105% (таблица 3).

Прецизионность методики оценивалась в трех вариантах: повторяемость (сходимость), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, при этом критерием приемлемости служило значение относительного стандартного отклонения (RSD) менее 2% [8], а также межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Таблица 3.

Результаты оценки правильности спектрофотометрического метода в испытании «количественное содержание»

Уровни	1	1	1	2	2	2	3	3	3
Навеска мази, г	1,8	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	2,2	2,2	2,2
Оптическая плотность	0,3392	0,3428	0,3305	0,3752	0,3730	0,3843	0,4072	0,4174	0,4256
Содержание серпистена, мкг/мл	176,9	180,7	175,0	199,9	198,7	204,7	221,4	219,0	217,5
Добавлено РСО серпистена*, мкг/мл	20,0	20,0	20,0	30,0	30,0	30,0	40,0	40,0	40,0
Содержание серпистена (ожидаемое), мкг/мл	196,9	200,7	195,0	229,9	228,7	234,7	261,4	259,0	257,5
Оптическая плотность	0,3652	0,3780	0,3655	0,4273	0,4239	0,4414	0,4793	0,4832	0,4866
Содержание серпистена (полученное), мкг/мл	194,4	201,2	194,7	227,6	225,8	235,1	255,3	257,4	259,2
Отклик, %**	98,73	100,25	99,85	99,00	98,73	100,17	97,67	99,38	100,66

**Примечание:** \*PCO серпистена добавлялся в водное извлечение мази в виде концентрированного (0,02%) раствора. К уровню 1 добавлялось 0,1 мл концентрированного раствора, к уровню 2–0,15 мл, к уровню 3–0,2 мл.

\*\*Процент восстановления (отклик) рассчитывался следующим образом:

$$\text{Отношение} = \frac{\text{Содержание серпистена (полученное)} \cdot 100 \%}{\text{Содержание серпистена (ожидаемое)}} [7].$$

Показано, что процент восстановления находится в интервале от 97,67 до 100,66%, а его средняя величина составляет 99,38%.

Определение сходимости выполнялось одним сотрудником при одних и тех же условиях: в одной лаборатории на одном приборе (спектрофотометр СФ-2000, Россия) в течение короткого промежутка времени проведено 5 параллельных испытаний количественного содержания серпистена в мази. Данные приведены в таблице 4. Установлено, что относительное стандартное отклонение составляет 0,72%, что, в свою очередь, говорит о высокой сходимости результатов количественного определения.

Внутрилабораторную прецизионность методики оценивали посредством определения количественного содержания серпистена в мази в пределах одной лаборатории. Анализ выполняли два химика в разные дни на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 4.

Результаты оценки сходимости методики выполнения теста «количественное содержание»

Обнаружено серпистена, мкг/г	Метрологические характеристики
196,0	$\bar{X}=201,3; S^2=12,7;$ $S=3,56; S_x=1,45; RSD=0,72\%;$ $t(95\%, 5)=2,57; \Delta\bar{x}=3,7;$ $\epsilon=4,55\%; \bar{\epsilon}=1,85\%$
201,0	
199,0	
202,0	
206,0	
204,0	

Таблица 5.

Результаты оценки повторяемости методики теста «количественное содержание»

№ серии	Дата	Сотрудник	Обнаружено серпистена, мкг/г	Метрологические характеристики
10612	02.07.12	Сотрудник 1	197,2	$\bar{X}=198,8; S^2=3,1;$ $S=1,76; S_x=0,72;$ $RSD=0,36\%;$ $t(95\%, 5)=2,57; \Delta\bar{x}=1,9;$ $\epsilon=2,28\%; \bar{\epsilon}=0,93\%$
10612	02.07.12	Сотрудник 1	199,7	
10612	03.07.12	Сотрудник 1	198,2	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	197,5	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	201,9	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	198,1	

Полученные результаты позволяют утверждать, что аналитическая методика количественного определения серпистена в мази характеризуется внутрилабораторной прецизионностью.

На заключительном этапе нами изучалась межлабораторная прецизионность. С этой целью проанализированы три серии мази серпистена двумя сотрудниками на двух приборах: СФ-2000 (сотрудник 1) и СФ-103 (сотрудник 2), в разные промежутки времени. Критерием приемлемости служило выполнение следующего неравенства:

$$F(95\%, 8, 8) \geq F_{\text{выч}}$$

где  $F(95\%, 8, 8)$  – значение критерия Фишера при уровне значимости 95% и числах степеней свободы равных 8;  $F_{\text{выч}}$  – вычисленное значение критерия Фишера, который является отношением большей дисперсии к меньшей. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости методики теста «количественное содержание»

№ серии	Дата	Сотрудник	Обнаружено серпистана, мкг/г	Метрологические характеристики
10612	02.07.12	Сотрудник 1	197,2	$\bar{X}=200,5; S_1^2=6,02;$ $S=2,45; S_x=0,82;$ $RSD=0,41\%;$ $t(95\%, 8)=2,36; \Delta\bar{x}=1,9;$ $\varepsilon=2,88\%; \bar{\varepsilon}=0,97\%$
10612	02.07.12	Сотрудник 1	199,7	
10612	02.07.12	Сотрудник 1	204,6	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	202,2	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	199,0	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	201,4	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	200,6	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	202,4	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	197,3	
10612	04.07.12	Сотрудник 2	204,8	
10612	04.07.12	Сотрудник 2	199,7	
10612	04.07.12	Сотрудник 2	203,3	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	203,7	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	199,4	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	201,9	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	201,6	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	203,1	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	201,8	

Рассчитанное значение  $F_{\text{выч}}$  оказалось меньше табличного [ $F(95\%, 8, 8)=3,44$ ], что позволяет сделать вывод об отсутствии статистически значимого различия между выборками, таким образом, оба массива данных можно объединять в одну генеральную совокупность.

На заключительном этапе нами проведен сравнительный анализ средних значений массивов, полученных двумя аналитиками, в ходе которого установлено, что экспериментальное значение  $t$ -критерия Стьюдента не превышает табличного значения. Таким образом, результаты количественного определения серпистана, полученные разными аналитиками на двух разных приборах в разное время, статистически неразличимы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения серпистана в мягкой лекарственной форме – мази методом УФ-спектрофотометрии. Пригодность методики подтверждена ее валидацией по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Данная методика использована в нормативных документах для стандартизации серпистана в мягких лекарственных формах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В.В. Володин, Ю.С. Сидорова, В.К. Мазо. 20-гидроксиэкдизон – растительный адаптоген: анаболическое действие, возможное использование в спортивном питании // Вопросы питания. 2013. № 6. С. 24–30.
2. С.О. Володина, В.В. Володин, И.Ф. Чадин. Ресурсы, биотехнология и использование экдистероидсодержащих растений // Известия Самарского науч. центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1(3). С. 668–674.
3. Y.A.I. Naggar, M. Ghorab, K. Mohamed. Phytoecdysteroids: isolation and biological applications // American journal of life sciences. 2017. V. 5. Is. 1. P. 7–10.
4. N.Z. Mamdalieva, D. Egamberdieva, R. Lafont, J.P. Girault. Phytoecdysteroids and antibacterial activity of the plant *Coronaria flos-cuculi* // Chemistry of Natural Compounds. 2008. V. 44. № 3. P. 404–406.
5. Д.Е. Липин, Н.А. Левочкина. Определение параметров для количественного определения суммы фитоэкдистероидов в лекарственных формах // Вестник Перм. гос. фармацев. акад. 2013. № 10. С. 84–85.
6. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
7. И.Д. Гулякин и др. Валидация методики количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной форме // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3. С. 118–122.
8. Н.А. Эпштейн. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фармац. журн. 2004. Т. 38. № 4. С. 40–56.