

Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов,
В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЯРНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ ГИДРОКСИЭТИЛКРАХМАЛОВ МЕТОДОМ ^1H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8; e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

Валидирована методика определения молярного замещения гидроксипроцетилкрахмалов методом ^1H ЯМР спектроскопии по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, диапазон применения. Методика может быть использована для оценки параметра "молярное замещение" в рамках проведения фармакологической экспертизы качества лекарственных субстанций гидроксипроцетилкрахмалов.

Ключевые слова: гидроксипроцетилкрахмалы; молярное замещение; валидация методики; ^1H ЯМР спектроскопия.

Гидроксипроцетилированные крахмалы (ГЭК) представляют собой частично замещенные поли(2-гидроксипроцетил)крахмалы из кукурузы восковой спелости или картофеля, которые содержат главным образом амилопектин [1]. Растворы ГЭК являются эффективными коллоидными плазмозаменителями, которые на протяжении последних 50 лет широко используют в клинической практике [2–4]. Тип используемого в медицинской практике ГЭК определяется 2 показателями: средней молекулярной массой и количеством гидроксипроцетилированных групп на 1 α -D-глюкопиранозный остаток (α -D-Glcp), выраженным в виде молярного замещения (МЗ) [1]. ГЭК условно делят на 3 поколения. Первое поколение имеет высокую молекулярную массу (450 кДа), высокий показатель МЗ (0,6–0,7) и выраженные побочные эффекты (кумуляция, негативное влияние на гемостаз, нефротоксичность), что не позволяет использовать их при массивной кровопотере [5]. Второе поколение крахмалов имеет меньшую молекулярную массу (200–240 кДа) и МЗ в пределах 0,5–0,6. Третье поколение крахмалов имеет молекулярную массу 130 кДа и МЗ = 0,4–0,42. По величине МЗ лекарственные субстанции ГЭК классифицируются на высокозамещенные (МЗ = 0,6–0,75), среднезамещенные (МЗ около 0,5) и низкозамещенные (МЗ = 0,4 и менее) [6]. В настоящее время в медицин-

ской практике используют, главным образом, средне- и низкозамещенные растворы ГЭК второго и третьего поколений.

В фармакопейном анализе параметр МЗ устанавливают по газохроматографической методике на основе количественного определения йодэтана, высвобождающегося после кислотного гидролиза макромолекулы ГЭК [1], при этом данные, полученные по газохроматографической методике, трудновоспроизводимы, а для получения статистически достоверных результатов требуется длительное время [7]. В литературе в качестве альтернативы предложена методика определения МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР спектроскопии [7, 8]. Ее преимуществом является простота пробоподготовки и сужение круга факторов, влияющих на неопределенность результата измерения. Спектральная информация, полученная в рамках одного эксперимента ^1H ЯМР, дает возможность оценить одновременно с величиной МЗ такой показатель качества фармацевтических субстанций ГЭК, как подлинность.

Целью данной работы является валидация методики определения МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР спектроскопии для дальнейшего использования ее в фармакопейном анализе.

Т а б л и ц а 1

Результаты оценки линейности валидируемой методики

Образец	МЗ		Среднее значение МЗ	МЗ по уравнению линейной регрессии	Образец	МЗ		Среднее значение МЗ	МЗ по уравнению линейной регрессии
	ГХ	ЯМР				ГХ	ЯМР		
Крахмал	0,0	-0,007	-0,007	0,0	ГЭК 200/0.5 № 20110401	0,51	0,484	0,502	0,505
		-0,006				0,508			
		-0,007				0,513			
ГЭК 130/0.4	0,40	0,396	0,405	0,396	НЭТА 206К	0,52	0,505	0,510	0,515
		0,412				0,511			
		0,407				0,514			
ГЭК 200/0.5 № 20100302	0,48	0,500	0,492	0,476	НЭТА 130К	0,73	0,715	0,714	0,723
		0,493				0,709			
		0,482				0,717			

Таблица 2
Статистические характеристики линейной регрессии

Статистическая характеристика	Результат
Наклон (b)	0,991
Отрезок на оси ординат (a)	-0,000025
Доверительный интервал ($p = 95\%$)	$\pm 0,029$
Коэффициент корреляции (r)	0,9991

Экспериментальная часть

При валидации методики использовали крахмал растворимый для анализа ISO производства Merck (кат. № 1.01252.0100), образцы лекарственных субстанций ГЭК 200/0.5 серия 20100302 (среднемассовая молекулярная масса $M_w = 204,0$ кДа), ГЭК 200/0.5 серия 20110401 ($M_w = 199,8$ кДа) производства “Wuhan Hust Life Science & technology Co., Ltd.”, Китай, ГЭК 130/0.4 серия 17121742 ($M_w = 133,0$ кДа) производства “Fresenius Kabi” (Австрия) и стандартные образцы ГЭК НЕТА 130К ($M_w = 130,6$ кДа), НЕТА 206К ($M_w = 206,5$ кДа) производства “American polymer standards corporation” (США).

Регистрацию спектров ЯМР ^1H осуществляли с помощью ЯМР-спектрометра Agilent DD2 NMR System 600 с 5 мм инверсным мультядерным датчиком с градиентной катушкой, в растворах D_2O , с ацетоном- d_6 в качестве внутреннего стандарта. Расчет статистических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала, коэффициента детерминации, фактических и табличных значений F -критериев Фишера, t -критериев Стьюдента) выполняли с помощью формул [9] при уровне значимости $p = 0,05$, используя программное обеспечение MS Excel 2007.

В качестве референтной использовалась методика определения МЗ ГЭК методом газовой хроматографии [1]. Определение молярного замещения в исследуе-

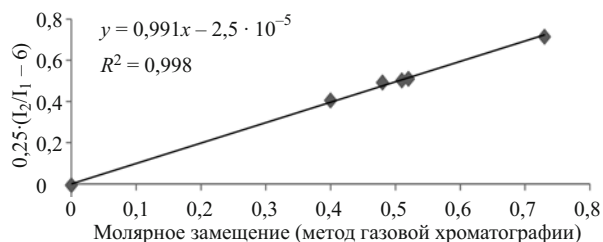


График зависимости приведенной интегральной интенсивности от степени МЗ.

мых образцах ГЭК проводили с использованием газового хроматографа фирмы Agilent, модель GC 7890A, с масс-селективным детектором MSD 5975C и автосемплером G 4513A на капиллярной кварцевой колонке DB-1 (газ-носитель – гелий; скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин; температура инжектора – 200 °С; температура интерфейса – 280 °С; время хроматографирования – 20 мин; объем вводимой пробы – 0,5 мкл).

Методика испытания. Анализируемые образцы в количестве 5 мг растворяют в 0,5 мл D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), добавляют 10 мкл дейтерированного ацетона. Растворы ГЭК в D_2O переносят в ампулы ЯМР, помещают в ЯМР-спектрометр и термостатируют 15 мин при температуре 353 К. Спектры ^1H регистрируют при температуре 353 К с подавлением сигнала растворителя (угол поворота намагниченности 45° , время релаксации 11 с, 512 накоплений, число точек аналого-цифрового преобразования 64к, экспоненциальное умножение 0,3 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы в диапазоне спектра 0 – 7 м.д.). Шкалу химических сдвигов градуируют по отношению к сигналу ацетона ($\delta = 2,22$ м.д.). При отсутствии внутреннего стандарта химические сдвиги можно измерять относительно сигнала воды ($\delta = 4,28$ м.д. при 353 К). Интегрируют 2 области спектра [8]:

Результаты исследования правильности методики

Таблица 3

Образец	Введено	Найдено	$Z_i, \%$	Образец	Введено	Найдено	$Z_i, \%$
ГЭК 130/0,4	0,40	0,396	99,00	НЕТА 206К	0,52	0,505	97,12
		0,412	103,00			0,511	98,27
		0,407	101,75			0,514	98,85
ГЭК 200/0.5 № 20100302	0,48	0,500	104,17	НЕТА 130К	0,73	0,715	97,95
		0,493	102,71			0,709	97,12
		0,482	100,42			0,717	98,22
ГЭК 200/0,5 № 20110401	0,51	0,484	94,90				
		0,508	99,61				
		0,513	100,59				
Среднее значение (Z), %							99,58
Систематическая погрешность ($\delta = \bar{Z} - 100 $), %							0,42
Стандартное отклонение, %							2,536
Коэффициент вариации, %							2,547
Доверительный интервал ($p = 95\%$), %							$\pm 1,41$

1) 4,48 – 5,90 м.д., содержит сигналы аномерных протонов Н(1) замещенных и незамещенных остатков α -D-Glcp;

2) 3,15 – 4,23 м.д., содержит сигналы остальных протонов ГЭК (6 протонов α -D-Glcp и 4 протона гидроксильных групп модифицированной макромолекулы амилопектина).

Величина МЗ равна приведенной относительной интегральной интенсивности сигналов гидроксильных групп:

$$MЗ = 0,25 (I_2/I_1 - 6), \quad (1)$$

где I_1 и I_2 — интегральные интенсивности спектральных областей 1 и 2 соответственно.

Для каждого образца ГЭК рассчитывают 5 значений МЗ, варьируя настройку фазы сигналов и коррекцию базовой линии одного Фурье-преобразованного спектра. Итоговые величины МЗ определяют как среднее арифметическое измеренных значений.

Результаты и их обсуждение

Валидацию методики определения МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР спектроскопии проводили согласно требованиям отечественных и зарубежных руководств по валидации методик анализа [9 – 12]. В процессе валидации проведена оценка следующих валидационных параметров: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, диапазон применения. Расчет статистических характеристик валидационных параметров проводили в соответствии с требованиями нормативных документов [13, 14]. Ввиду отсутствия на рынке стандартных образцов ГЭК с аттестованным значением МЗ для оценки валидационных параметров были использованы значения МЗ, полученные с помощью референтной фармакопейной методики определения МЗ ГЭК методом газовой хроматографии [1].

Диапазон применения. В настоящее время в медицинской практике используют, главным образом, растворы ГЭК второго и третьего поколений, поэтому их значения МЗ приняты нами за номинальные. Диапазон применения данной методики составляет от 0 до 120 % от номинальных значений МЗ. В рамках этого диапазона МЗ (0 – 0,73) доказаны приемлемые линейность, правильность и прецизионность методики.

Линейность. Для оценки линейности проводили анализ серии из 5 растворов ГЭК и раствора немоди-

фицированного крахмала (МЗ = 0). Каждый образец анализировали в 3 повторениях. На основании полученных данных, представленных в табл. 1, были рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида $y = bx + a$, где y — среднее значение измеренной приведенной относительной интегральной интенсивности сигналов гидроксильных групп ($0,25 (I_2/I_1 - 6)$), рассчитанное по трем спектрам, x — значение МЗ, полученное с использованием референтной методики.

График и уравнение регрессионной прямой приведены на рисунке. Статистические характеристики установленной линейной регрессии, рассчитанные по формулам [9], приведены в табл. 2. Доверительный интервал характеризует разброс точек относительно прямой.

В соответствии с требованиями [9] критериями приемлемости линейной зависимости являются статистическая незначимость отрезка, отсекаемого на оси ординат (свободного члена a для рассчитанной регрессионной прямой) и коэффициент корреляции $r \geq 0,990$. Величина a характеризует систематическую погрешность и считается статистически незначимо отличающейся от нуля, если она не превышает свой доверительный интервал. Как следует из данных табл. 2, валидируемая методика характеризуется приемлемой линейностью.

Правильность. Для оценки правильности валидируемой методики использовали результаты, полученные в ходе установления линейности. В соответствии с требованиями [9, 10] для всех образцов рассчитывали коэффициент извлечения — отношение “найденно : введено” (Z_i), для которого определяли стандартное отклонение, коэффициент вариации, доверительный интервал и систематическую погрешность (табл. 3).

Правильность валидируемой методики оценивали по 2 критериям приемлемости:

1) доверительный интервал должен включать 100 % значение коэффициента извлечения [10];

2) систематическая погрешность не должна превышать свой доверительный интервал (критерий статистической незначимости) [9].

Как видно из данных табл. 3, оба требования выполняются: 100 % входят в интервал 98 – 101 %; систематическая погрешность (δ) является статистически не отличимой от нуля ($0,423 \leq 1,405$). Таким образом, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью.

Таблица 4

Результаты исследования сходимости валидируемой методики

Образец	МЗ _{изм}	Z _i , %	Образец	МЗ _{изм}	Z _i , %
НЕТА 206 – 1	0,516	99,23	НЕТА 206-4	0,507	97,50
НЕТА 206 – 2	0,503	96,73	НЕТА 206-5	0,506	97,31
НЕТА 206 – 3	0,506	97,31	НЕТА 206-6	0,515	99,04
Среднее значение (\bar{Z}), %				97,85	
Стандартное отклонение, %					1,028
Коэффициент вариации, %					1,050
Доверительный интервал ($p = 95 \%$), %					$\pm 1,08$

Результаты исследования внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики

Образец	Внесено	Оператор 1		Оператор 2	
		найдено	Z_i , %	найдено	Z_i , %
ГЭК 130/0.4	0,40	0,396	99,00	0,392	98,00
		0,412	103,00	0,397	99,25
		0,407	101,75	0,387	96,75
НЕТА 206К	0,52	0,505	97,12	0,516	99,23
		0,511	98,27	0,503	96,73
		0,514	98,85	0,506	97,31
НЕТА 130К	0,73	0,715	97,95	0,701	96,03
		0,709	97,12	0,708	96,99
		0,717	98,22	0,713	97,67
Среднее (Z_i), %		99,03		97,55	
Стандартное отклонение, %		2,148		1,047	
Коэффициент вариации, %		2,169		1,073	
Доверит. интервал ($p = 95\%$), %		$\pm 1,65$		$\pm 0,80$	
Объединенное среднее значение (\bar{Z}), %				98,29	
Объединенное стандартное отклонение, % *				1,690	
Объединенный коэффициент вариации, %				1,719	
Объединенный доверительный интервал, %				$\pm 1,19$	
F -критерий Фишера ($F_{\text{табл}} = 3,44$)				$F_{\text{факт}} = 3,31$	
t -критерий Стьюдента ($t_{\text{табл}} = 2,12$)				$t_{\text{факт}} = 1,92$	

* Объединенные значения стандартного отклонения, коэффициента вариации и доверительного интервала с учетом данных 2 операторов рассчитаны в соответствии с требованиями [13, 14].

Прецизионность. Прецизионность оценивали на уровнях сходимости и внутрилабораторной прецизионности.

Сходимость валидируемой методики оценивали по результатам 6 определений для стандартного образца ГЭК НЕТА 206К с номинальной величиной МЗ (0,52). Полученные в условиях сходимости результаты измерения отношения “найдено : внесено” (Z_i) и их статистической обработки представлены в табл. 4.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам 3 определений для каждого из 3 уровней определяемой величины МЗ (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области. Полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности (различные операторы, различные дни) результаты измерения отношения “найдено : внесено” (Z) и их статистической обработки представлены в табл. 5.

При изучении прецизионности на всех уровнях следует представлять стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) и доверительный интервал [9, 10]. Рассчитанные величины коэффициента вариации (1,05 и 1,72 % для сходимости и внутрилабораторной прецизионности соответственно) не превышают приемлемый диапазон значений ($\leq 2\%$ [10]). В случае оценки приемлемости внутрилабораторной прецизионности нормативные и методические документы в сфере GMP [10, 11] рекомендуют рассчитывать статистические критерии Фишера (F) и Стьюдента (t) и сравнивать фактические значения $t_{\text{факт}}$ и $F_{\text{факт}}$ с табличными — максимальными значениями критериев под влиянием случайных фак-

торов при текущих степенях свободы и при заданном уровне значимости ($t_{\text{табл}}$ и $F_{\text{табл}}$). Как следует из данных табл. 5, табличные значения F и t превосходят фактические значения, что свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений 2 операторов при уровне значимости 95 %.

Специфичность. Специфичность должна обеспечивать возможность различать соединения близкого строения, которые могут присутствовать в образце совместно с определяемым компонентом. В случае ГЭК таким соединением является немодифицированный крахмал, в протонном спектре которого области химических сдвигов сигналов (4,68 – 5,40 м.д. и 3,40 – 4,10 м.д. [15]) перекрываются с областями химических сдвигов сигналов ГЭК (4,48 – 5,90 м.д. и 3,15 – 4,23 м.д.). Для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов при оценке МЗ ГЭК с помощью валидируемой методики было измерено значение МЗ немодифицированного крахмала. Нулевое значение МЗ крахмала (табл. 1) свидетельствует о том, что вещества, имеющие близкое строение с ГЭК, не мешают идентифицировать и определять долю гидроксипропиловых групп относительно α -D-гликозидных фрагментов в макромолекулах ГЭК. Высокая степень близости между значениями МЗ, полученными с использованием данной методики и с использованием ранее оцененной по пригодности референтной методики (см. табл. 3), является дополнительным доказательством специфичности методики определения МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР спектроскопии.

Таким образом, методика определения МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР спектроскопии была валидирована по основным параметрам на примере лекарственных субстанций и стандартных образцов ГЭК, что доказывает ее возможное применение для оценки молярного замещения ГЭК при проведении фармакопейного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. 01 / 2011:1785 Starches, hydroxyethyl, European Pharmacopoeia, 7th ed., Vol. 6, European Department for the Quality of Medicines, Strasbourg (2011), pp. 2984 – 2988.
2. И. В. Молчанов, О. А. Гольдина, Ю. В. Горбачевский, *Растворы гидроксипропилированного крахмала — современные и эффективные плазмозамещающие средства инфузионной терапии*, Издательство НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, Москва (1998).
3. E. Rivers., V. Nguyen., S. Havstad, et al., *New Engl. J. Med.*, **345**(19), 1368 – 1377 (2001).
4. V. Brandstrup, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, **20**(2), 265 – 283 (2006).
5. Д. В. Дмитриев, *Медицина неотлож. сост.*, **49**(2), 68 – 74 (2013).
6. С. С. Петриков, В. В. Крылов, Ю. В. Титова, *Интенсив. тер.*, **2**, 11 – 15 (2008).
7. Е. П. Прокофьев, О. А. Юрин, *Хим.-фарм. журн.*, **24**(7), 82 – 84 (1990).
8. Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(8), 44 – 48 (2015); *Pharm. Chem. J.*, 559 – 563 (2015).
9. Н. В. Юргель (ред.), *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации)*. Спорт и культура-2000, Москва (2007).
10. В. В. Береговых (ред.), *Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, Литерра, Москва (2008).
11. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, part 2, *Validation*, WHO / VSQ / 97.02, Geneva (1999).
12. В. П. Георгиевский (ред.), *Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств*, Т. 3, Издательство “НТМТ”, Харьков (2011).
13. РМГ 61-2003 ГСИ, *Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки*, Издательство стандартов, Москва (2004).
14. 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*, Издательство стандартов, Москва (2002).
15. G. S. Nilsson, K.-E. Bergquist, U. Nilsson, et al., *Starch*, **48**(10), 352 – 357 (1996).

Поступила 06.10.2015

VALIDATION OF TECHNIQUE FOR DETERMINING THE MOLAR SUBSTITUTION OF HYDROXYETHYL STARCH BY MEANS OF ^1H NMR SPECTROSCOPY

N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev*, V. I. Krylov, V. A. Yashkir, and V. A. Merkulov

Scientific Center for Expert Evaluation of Medical Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia;

* e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

The technique of determination of the degree of hydroxyethyl starch molar substitution based on ^1H NMR spectroscopy was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, precision, and range of applicability. The technique can be used for determining the “molar substitution” index in the context of pharmacological examination of drug substances containing hydroxyethyl starches.

Keywords: hydroxyethyl starch; molar substitution; validation of technique; ^1H NMR spectroscopy.