

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ МЕДЬ-ЗАВИСИМОГО АУТООКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК СПОСОБА ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ, СВЯЗЫВАЮЩИХ d-ЭЛЕМЕНТЫ

*Д.Д. Шамшина, Р.А. Литвинов*

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

В данной работе описана валидация методики медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты на примере пиоглитазона. Валидация проведена путем расчета линейности, сходимости, прецизионности и предела количественного обнаружения (с определением сходимости предела количественного обнаружения). По результату работы составлены практические рекомендации.

*Ключевые слова:* аскорбиновая кислота, аутоокислация, слабая хелация, сульфат меди (II), валидация.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-1(65)-115-117

## VALIDATION OF THE ASCORBIC ACID AUTOXYDATION METOD (COPPER-INDUCED) AS A METOD FOR ESTIMATION OF EVALUATION OF ACTIVITY OF COMPOUNDS CONNECTING d-ELEMENTS

*D.D. Shamshina, R.A. Litvinov*

*Federal State Educational Institution of Higher Education «The Volgograd State Medical University of Public Health Ministry of the Russian Federation»*

This paper describes the analysis of the results of validation experiments for: repeatability, linearity, precision and quantification limits (with analysis of repeatability of quantification limits) for the ascorbic acid autoxydation metod (copper-induced). Based on the results of the work, practical recommendations were made.

*Key words:* Ascorbate, autoxydation, pure chelation, copper sulfatе (II), validation.

Поиск веществ, связывающих d-элементы, выступающие в роли коферментов, или имеющие иную биологическую активность (Cu, Zn, Fe и др), является новым актуальным подходом в разработке ангиопротекторных, нейропротекторных, противовоспалительных, противоатеросклеротических, противовирусных средств [1–5]. Процесс изменения электронной заселенности d-орбитали при образовании координационной связи сопровождается потерей элементом нежелательной каталитичности и отрицательным модулированием коферментных свойств даже при слабой степени связи (распространенный в литературе термин, описывающий подобную активность – *roog chelator* – слабохелатирующий агент) [6]. Метод оценки способности веществ предотвращать металл-опосредованный катализ в реакции аутоокисления аскорбиновой кислоты чувствителен к изменению активности d-элементов. Метод способен выявлять изменение активности, вызванное экранированием элемента (хелация), образованием координационной связи, а также ковалентным связыванием. По этой причине данный метод наиболее приемлем на этапе предварительного скрининга.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

На примере пиоглитазона валидировать методику медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты как способа оценки активности соединений, влияющих на биологическую активность d-элементов.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект определения:** Пиоглитазон (Sigma-Aldrich).

**Реактивы:** Аскорбиновая кислота (х.ч.), сульфат меди (II) пятиводный (х.ч.) деионизированная вода (деионизатор Prodeion 10 VS).

**Валидация метода:** Активность пиоглитазона в пробах определялась спектрофотометрически. В настоящей работе описан анализ достоверности через определение: линейности, сходимости, прецизионности и предела количественного обнаружения (ПКО).

**Стандартная операционная процедура:** Для стандартного теста готовили раствор индикатора – 100 мкМ аскорбиновой кислоты в деионизированной воды. Для предотвращения окисления новую партию раствора подготавливали путем 1000-кратного разведения маточного (100 мМ до 100 мкМ), что связано с большей сохранностью высококонцентрированного раствора при хранении [7]. Перед проведением реакции в кварцевую кювету ( $V = 3$  мл,  $l = 10$  мм), установленную в спектрофотометре APEL PD 303 UV (Япония), вносили 2,5 мл 100 мкМ раствора аскорбиновой кислоты. Целевая оптическая плотность данного раствора, готового к инициации реакции аутоокисления, при рабочей длине волны  $\lambda$  265 нм составляла  $1250 \pm 50$  (измерение против деионизированной воды, для удобства все значения оптической плотности множены на 1000). Пиоглитазон растворяли в 1 мл ДМСО 99 % в концентрации

2,33 мМ (маточный раствор). При определении ПКО готовили серийные разведения, понижая концентрацию маточного раствора пиоглитазона на 33 %. Индуктор аутоокисления – сульфат меди (II) пятиводный – растворяли в деионизированной воде в концентрации 4,66 мМ, что эквивалентно 2,95 мМ раствору безводной соли. 20 мкл маточного раствора пиоглитазона инкубировали при 37 °С вместе с 40 мкл раствора индуктора аутоокисления. В контроле маточный раствор пиоглитазона заменяли на ДМСО 99 %. После проведения инкубации смесь вносили в кювету с аскорбиновой кислотой, фиксировали падение оптической плотности при длине волны  $\lambda$  265 нм через 60 секунд после начала реакции.

**Статистическая обработка:** в оценке использовали стандартные формулы расчета среднего значения (M), стандартного отклонения (S), относительного стандартного отклонения (RSD%) и среднего доверительного интервала (CI). Корреляционный анализ данных проводили методами линейной и нелинейной регрессии. Статистическую обработку выполняли с применением ANOVA (пост-тест Туке,  $p < 0,05$ ). Все операции выполняли в пакете программ GraphPad Prism 5.0 и MicroSoft Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Валидация методики

Сходимость методики доказали в ходе двух серий по пять измерений в каждой (три показания на измерение) для стандартных растворов с конечной концентрацией пиоглитазона 75 мкМ, сульфата меди (II) пятиводного 150 мкМ (эквивалентно 95 мкМ безводной соли) и 100 мкМ аскорбиновой кислоты. Для оценки сходимости методики высчитывали среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и средний доверительный интервал. Значения приводятся в табл. 1.

Критерий сходимости методики: значение RSD% < 10 %.

Таблица 1

### Показатели в оценке сходимости при валидации методики медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты

# Номер пробы	Серия #1	Серия #2
1	700	720
2	700	828
3	800	853
4	860	732
5	776	775
M	767,20	781,60
SD	68,55	58,20
RSD (%)	8,96	7,45
CI ( $p = 0,95$ ) для среднего значения	767,2 ± 85,1	781,6 ± 72,3

Методика считается сходимой, поскольку значение RSD%, полученное в каждой серии, не превышает 10 % для каждой серии проб.

Прецизионность методики оценивали по результатам (20 определений), полученным двумя аналитиками в два разных дня работы с типичной серией растворов, описанной выше. Значения представлены в табл. 2.

Таблица 2

### Показатели в оценке прецизионности при валидации методики медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты

Показатели	# Номер пробы	Светопоглощение	
ДЕНЬ 1	Аналитик 1	1	828
		2	766
		3	753
		4	782
		5	822
		6	743
	Аналитик 2	1	730
		2	739
		3	744
		4	748
		5	769
		6	837
ДЕНЬ 2	Аналитик 1	1	755
		2	776
		3	846
		4	730
		5	753
		6	807
	Аналитик 2	1	736
		2	721
		3	828
		4	766
		5	753
		6	782
M		769,25	
SD		38,59	
RSD (%)		5,02	
CI ( $p = 0,95$ ) для среднего значения		769,25 ± 18,05	

Методика считается прецизионной, если значение RSD% не более 20 %.

Предел количественного определения (ПКО) определяется как минимальное количество вещества, которое по результатам шести проб (три повторности на пробу) может быть количественно определено с точностью около 20 % RSD. Предел количественного обнаружения пиоглитазона составил 14,8 мкМ (ANOVA, пост-тест Туке). Данный показатель зависит от активности вещества на модели. Результат оценки сходимости ПКО представлен в табл. 3.

Таблица 3

**Показатели в оценке сходимости предела количественного обнаружения пиоглитазона при валидации методики медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты**

# Номер пробы	Светопоглощение
1	518
2	523
3	575
4	556
5	560
6	555
M	547,80
SD	22,41
RSD (%)	4,09
CI ( $p = 0,95$ ) для среднего значения	547,85 ± 23,55

Методика считается сходимой по ПКО, поскольку вычисленное RSD% не более 20 %.

Линейность определяли путем проведения стандартного теста (описан выше) с разными концентрациями пиоглитазона от ПКО до 75 мкМ (табл. 4).

Таблица 4

**Линейность от предела количественного определения до 75 мкМ**

Уровень	Концентрация, мкМ	Светопоглощение
1	14,8	883
	14,8	828
	14,8	853
2	22,2	812
	22,2	724
	22,2	825
3	33,3	660
	33,3	706
	33,3	680
4	50,0	695
	50,0	599
	50,0	537
5	75,0	535
	75,0	557
	75,0	555
Наклон		-4,973 ± 0,873
Точка пересечения с осью X		890,8 ± 38,9
Точка пересечения с осью Y		179,1
Квадратичный коэффициент корреляции		0,995

Методика считается линейной в диапазоне от ПКО до 75 мкМ, поскольку квадратичный коэффициент корреляции не менее 0,99.

Таким образом, методику определения способности веществ связывать d-элементы на примере пиоглитазона и сульфата меди (II) можно считать сходимой, прецизионной и линейной в изученном диапазоне концентраций.

**Практические рекомендации** (составлены по факту постановки валидируемой методики)

1. Отмечено, что анализ активности веществ с помощью с данной методики можно проводить по изменению оптической плотности раствора аскорбиновой кислоты при добавлении разных концентраций тестируемого вещества, а также по измерению скорости реакции от инициации до приобретения равновесного состояния в рекомендуемой, эмперически установленной концентрации 75 мкМ.

2. При концентрационном анализе рекомендуется снимать показания оптической плотности в 3 точках: исход (до добавления тестируемого вещества), инициация реакции (сразу после добавления) и 60 с после начала реакции (экспериментально установленная точка наибольшей разницы оптической плотности контроля с веществами разного уровня активности от слабо- до высокоактивных).

3. В оценке скорости реакции желательнее опираться на расчет полускорости  $T_{1/2}$ . Для этого необходимо фиксировать значения оптической плотности с коротким интервалом (1–10 с) до полной остановки реакции. Зависимость оптической плотности от времени необходимо проанализировать методом нелинейной регрессии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере пиоглитазона проведена валидация методики аутоокисления аскорбиновой кислоты (медь-зависимого). Методику, как способ определения способности веществ связывать d-элементы, можно считать сходимой, прецизионной и линейной в изученном диапазоне концентраций.

### ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Dusek P., Schneider S.A., Aaseth J. // J. Trace. Elem. Med. Bio. – 2016. – Vol. 38. – P. 81–92.
- Aneni E.C., Escolar E., Lamas G.A. // Curr. Atheroscler. Rep. – 2016. – Vol. 18.
- Lamas G.A., Navas-Acien A., Mark D.B., Lee K.L. // JACC. – 2016. – Vol. 67, № 20.
- Araszkiewicz A., Gandecka A., Nowicki M. et al. // Pol. Arch. Med. Wewn. – 2016. – Vol. 126 (11). – P. 84–853.
- Price D.L., Rhett P.M., Thorpe S.R., Baynes J.W. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276 (52). – P. 48967–48972.
- Carcelli M., Rogolino D., Sechi M. et al. // Eur. J. Med. Chem. – 2014. – № 18. – P. 594–600.
- Buettner G. R. // Method. Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 125–127.

### Контактная информация

**Литвинов Роман Александрович** – к. м. н., ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru