



## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** В настоящее время большое внимание уделяется контролю качества фармацевтических препаратов. Передовые разработки в сфере технологического оборудования позволяют получать необходимую для контроля качества информацию за короткий промежуток времени, однако, анализ и интерпретация этой информации трудоемки и занимают много времени. Среди основных проблем контроля качества лекарственных препаратов можно выделить такие, как оценка подлинности активного компонента, его массовой доли и определение примесей в препарате. Использование хемометрических методов как инструмента контроля качества лекарственных препаратов является актуальным благодаря быстрой обработке большого объема экспериментальных данных и возможности использования готовой модели для последующих анализов. Хемометрические методы направлены на решение двух основных типов задач: классификации - определению принадлежности объекта к какой-либо группе, и регрессии - предсказанию численных значений какого-либо параметра. Возможности хемометрических методов полностью отвечают поставленным задачам контроля качества лекарственных препаратов, что показывает их перспективность.

Объект исследования – гепарин, является одним из известных фармацевтических препаратов, широко распространенных в клинической практике в качестве антикоагулянтного средства. Гепарин является сложной биологической матрицей, состав которой определяется происхождением и методом производства. Нестабильный состава гепарина существенно затрудняет сертификацию его качества. Основными методами для количественной и качественной оценки примесного состава гепарина являются ЯМР спектроскопия и ВЭЖХ. Однако, эти методы требуют привлечения квалифицированных специалистов, наличия специализированного оборудования, дорогостоящих реактивов, а также значительного времени проведения анализа. Электронная и колебательная спектроскопия являются

альтернативой методам ЯМР и хроматографии, как инструменты скринингового контроля качества гепарина. Эти методы позволяют проводить быстрый, недеструктивный и чувствительный анализ с минимальной пробоподготовкой. Использование хемометрических подходов в анализе спектральных данных позволяет расширить их возможности.

**Целью работы** является изучение возможностей электронной и ИК спектроскопии в сочетании с хемометрической обработкой данных для оценки различных показателей образцов гепарина, являющихся сырьем для производства фармацевтических препаратов.

Достижение поставленной цели включало решение следующих **задач**:

1. Изучение спектральных характеристик образцов гепарина, полученных методами электронной и ИК спектроскопии.
2. Изучение спектральных данных методом главных компонент (МГК), а также изучение возможностей классификации образцов гепарина по различным показателям методами одноклассового и многоклассового моделирования.
3. Оценка влияния предварительной обработки (ПО) ИК спектральных данных на показатели качества хемометрических моделей для классификации образцов гепарина.
4. Сравнение возможностей методов абсорбционной, флуоресцентной и ИК спектроскопии при классификации образцов гепарина по различным параметрам.

#### **Научная новизна работы.**

– Изучены возможности абсорбционной, флуоресцентной и ИК спектроскопии при классификации гепарина хемометрическими методами по различным параметрам.

– Определен алгоритм применения методов ПО ИК спектральных данных, позволяющий минимизировать влияние мешающего сигнала на результат хемометрического моделирования.

**Практическая значимость работы.** Показана возможность применения электронной и ИК спектроскопии в сочетании с хемометрической обработкой в качестве инструмента скрининга промежуточных продуктов при производстве лекарственных препаратов на основе гепарина.

**Материалы и методы исследования.** В работе изучено 114 образцов гепарина, отличающихся по степени очистки, животному происхождению и производителю (Табл. 1). Образцы гепарина предоставлены лабораторией рутинного контроля качества Spectral Service (Cologne, Germany) и предварительно идентифицированы в соответствии со степенью очистки методом  $^1\text{H}$  – ЯМР спектроскопии. Изученные образцы гепарина получены в порошкообразной форме от различных производителей и являются промежуточным продуктом при производстве лекарственных форм.

Таблица 1 – Основные характеристики изученных образцов гепарина

Степень очистки	Животное	Производитель	Количество образцов
Очищенный	Свинья	1	12
		2	59
Очищенный	Бык	1	10
Очищенный	Овца	1	8
Неочищенный	Свинья	1	5

Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 220-350 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyōto, Japan) с разрешением 1 нм в кварцевых кюветах с толщиной оптического слоя 1 см.

Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 350-600 нм с использованием Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent

Technologies) с разрешением 1 нм при  $\lambda_{\text{ex}}=330$  нм и размере щелей 10x10 нм в кварцевых кюветах с толщиной оптического слоя 1 см.

ИК спектры регистрировали в диапазоне 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  на спектрофотометре IRAffinity-1S FTIR (Shimadzu, Kyōto, Japan) в таблетках KBr: 3 мг образца гепарина смешивали с 297 мг KBr, вакуумировали в течение 15 мин и прессовали на лабораторном прессе.

ПО спектральных данных с учетом требований используемого инструментального метода выполняли в OriginLab (OriginLab Corporation, USA). Chemometrics Add-in для Microsoft Excel использовали для хемометрических расчетов [35]. Блоки спектральных данных анализировали МГК, методами формального независимого моделирования аналогий классов (SIMCA) и проекции на латентные структуры - дискриминантный анализ (ПЛС-ДА). Классификационные модели строили отдельно для каждой группы образцов. Модели ПЛС-ДА строили для классификации гепарина высокой степени очистки в соответствии с его происхождением.

**Структура и объем работы.** Выпускная квалификационная работа (ВКР) состоит из введения, двух глав, заключения и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, уравнения и графические иллюстрации. Общий объем ВКР составляет 42 страницы, включая 20 рисунков и 11 таблиц.

#### **Основное содержание работы.**

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором обсуждаются современные методы контроля качества гепарина, проблемы и подходы к разработке методов экспресс-определения, позволяющих оценивать несколько параметров качества гепарина. Показаны перспективы применения хемометрической обработки спектральных данных.

В главе 2 описаны материалы и методы, используемые в работе, обсуждаются спектральные характеристики гепарина, а также представлен хемометрический анализ экспериментальных данных и его результаты.

### Спектральные характеристики гепарина

Каждый образец гепарина исследовали с помощью трех спектроскопических техник: ультрафиолетовой, флуоресцентной и инфракрасной спектроскопии. Для каждого метода полученные спектры приведены на рисунках 1, 2 и 3. Гепарин высокой степени очистки характеризуется низкоинтенсивными поглощением и флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра. Гепарин с высоким содержанием примесей можно выделить по наличию интенсивной полосы поглощения/флуоресценции в данной области. Однако при низком содержании примесей чистоту гепарина трудно определить на основе спектральных данных. В связи с этим, для анализа спектральных данных образцов с низким содержанием загрязняющих веществ использовали хемометрические методы.

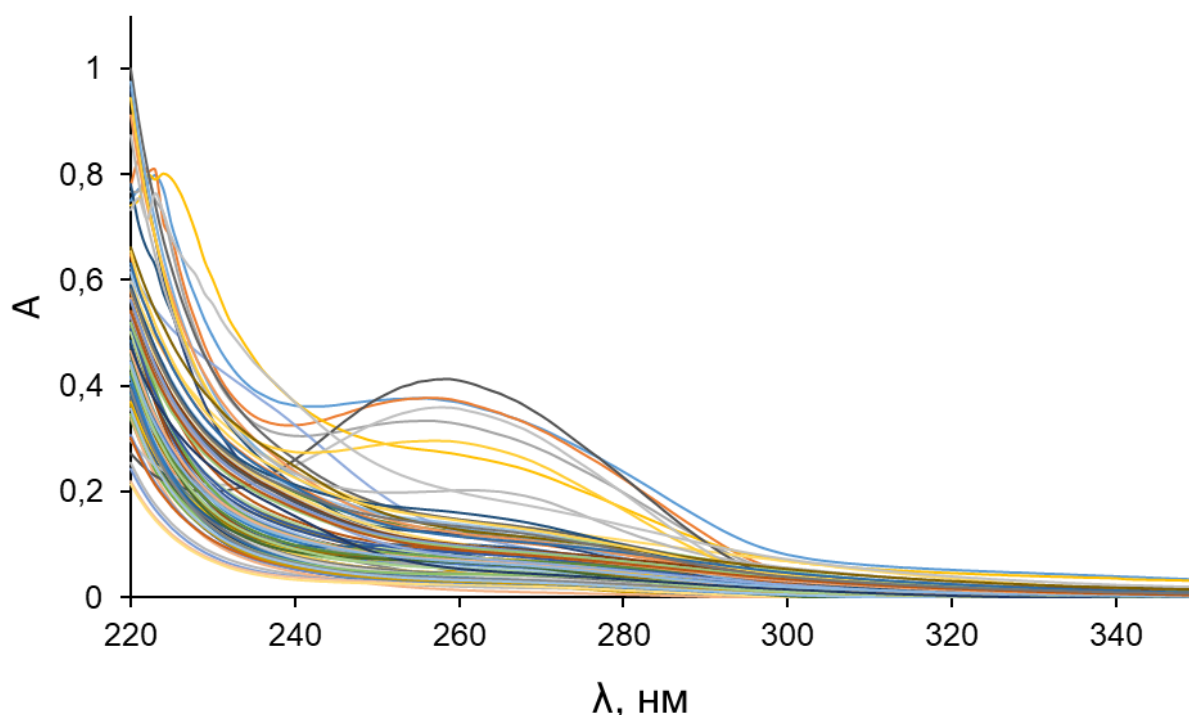


Рисунок 1 – Спектры поглощения гепарина в УФ области

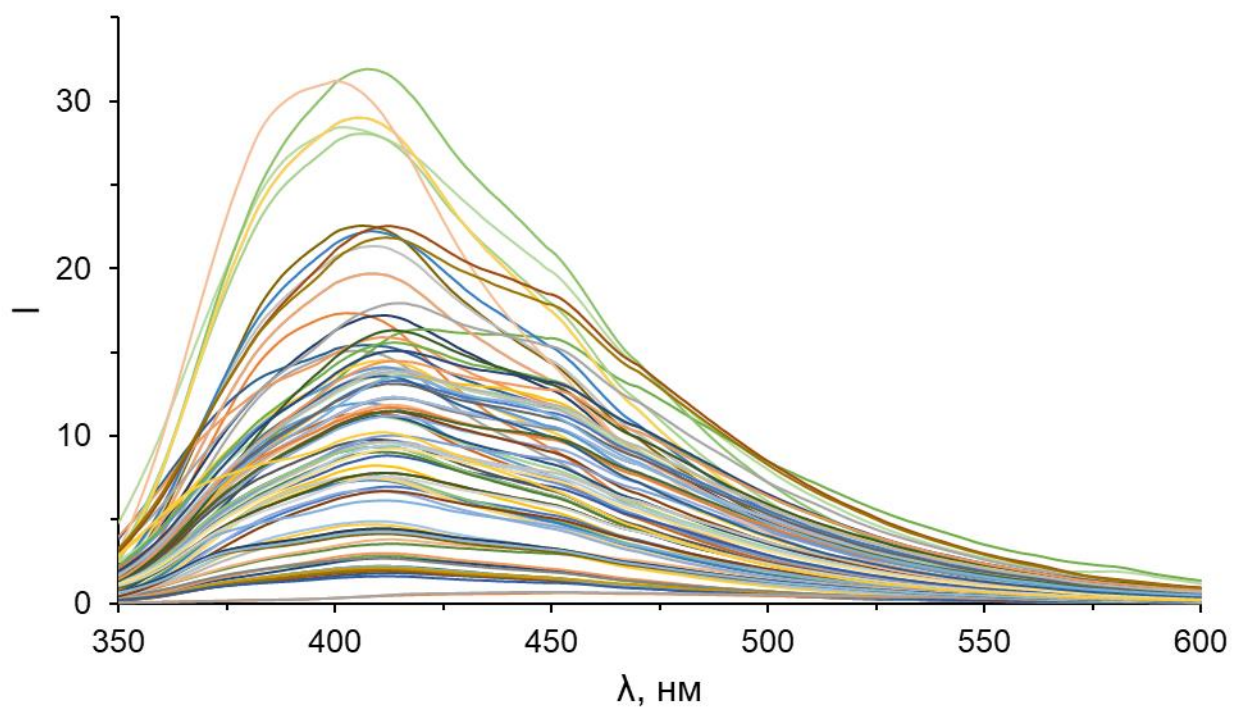


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции гепарина в УФ области

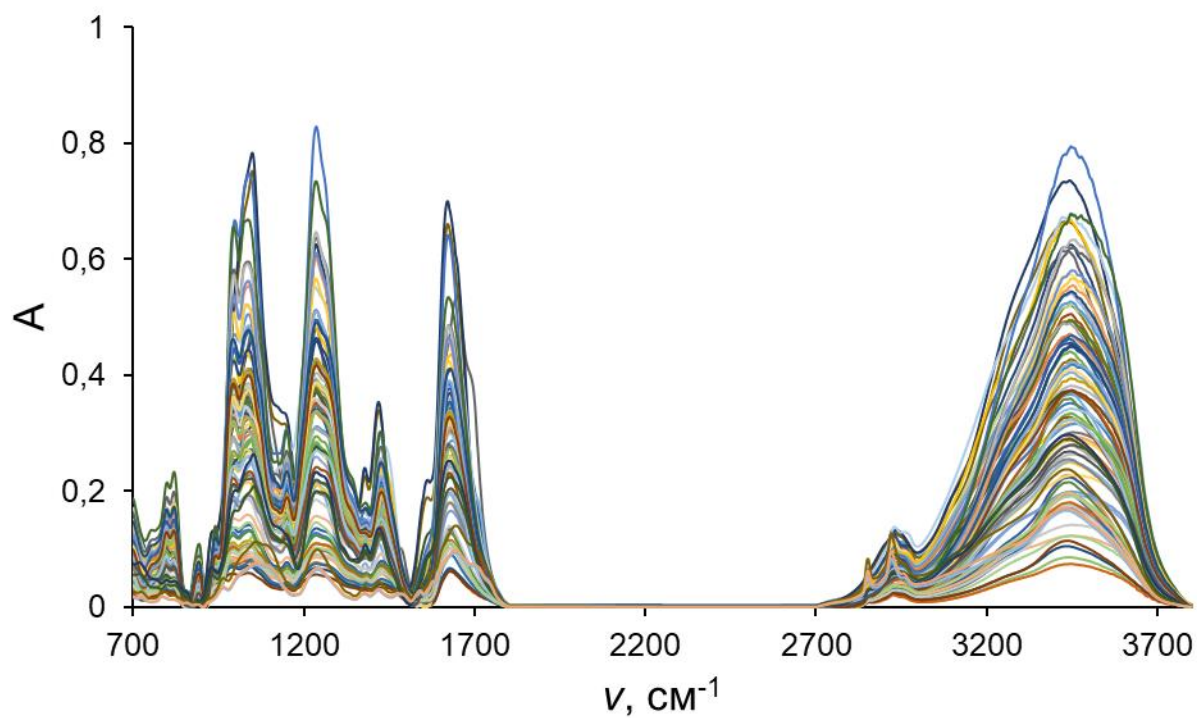


Рисунок 3 – Спектры поглощения гепарина в ИК области

Оценка содержания молекул загрязнителей в гепарине, основанная на ИК спектральных данных осложнена близостью спектральных характеристик

гепарина и его примесей, что делает необходимым использование хемометрических методов. В связи с тем, что ИК спектр содержит избыточную информацию, сравнили использование нескольких методов ПО спектральных данных, после чего проводили хемометрический анализ. Установили, что ПО ИК спектральных данных позволяет улучшить качество модели. В ходе исследования определили необходимые методы ПО для получения оптимальных результатов хемометрического моделирования.

### **Хемометрический анализ спектральных данных**

На основе полученных экспериментальных данных были сформированы три различные матрицы. В частности, результирующие матрицы имели размерности: 124x130 (УФ спектроскопия), 124x250 (флуоресцентная спектроскопия) и 124x800 (ИК спектроскопия). После чего каждый блок спектральных данных анализировали МГК.

Предварительный исследовательский анализ МГК проводили для каждого класса отдельно с целью обнаружения выбросов и получения информации о структуре данных, затем анализировали взаимодействия между соответствующими классами. Установлено, что данные каждого инструментального метода предоставляют необходимую информацию для оценки чистоты гепарина с помощью МГК. Кроме того, показаны возможности каждого спектроскопического метода при использовании МГК предоставлять дополнительную информацию о таких параметрах гепарина, как производитель, животное, из которого получен гепарин, а также неорганический ион, входящий в состав его соли.

При классификации гепарина по степени очистки с помощью метода SIMCA удалось получить высокий уровень корректной классификации для каждого инструментального метода (более 80%). Использование SIMCA для оценки происхождения гепарина позволило однозначно определять бычий и овечий гепарин, а также верно классифицировать 89% свиного гепарина.



Моделирование классов гепарина различного происхождения методом ПЛС-ДА показало высокие результаты для каждого представленного инструментального метода.

Таким образом, применение методов хемометрической обработки к спектральным данным позволяет оценивать не только степень чистоты гепарина, но и его происхождение, производителя и неорганический ион, входящий в состав соли гепарина. Таким образом, показали возможность получения нескольких параметров при проведении одного анализа, что является актуальным при разработке методов экспресс-определения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучили спектральные характеристики гепарина, полученные методами электронной и ИК спектроскопии. Установлено, что данные методы предоставляют информацию для оценки чистоты гепарина при высоком уровне загрязнений. Показано, что для анализа образцов с низким содержанием примесей необходимо использовать хемометрические методы.
2. Построили хемометрические модели на основе спектральных данных для каждого инструментального метода (УФ, флуоресцентная и ИК спектроскопия). Наилучший результат моделирования показала ИК спектроскопия: при использовании МГК возможно выделить соответствующие классы гепарина; SIMCA позволяет верно классифицировать 95% образцов в соответствии с чистотой и более 89% в соответствии с происхождением; при использовании ПЛС-ДА уровень корректной классификации образцов составляет более 82%. Моделирование с помощью метода ПЛС-ДА показало высокие результаты для каждого представленного инструментального метода. Хорошая предсказательная способность хемометрических моделей для обнаружения загрязнений в составе гепарина показывает потенциал спектроскопических методов в сочетании с хемометрикой для задачи скрининга. Данный подход разработан только в качестве инструмента скрининга и не рассматривается в качестве замены ни для одного из методов, требуемых в соответствии со стандартом.
3. Изучили возможности различных спектроскопических методов (УФ, флуоресцентная и ИК спектроскопия) для оценки качества состава гепарина на основе хемометрического анализа. Показали, что анализ МГК на основе данных флуоресцентной спектроскопии позволяет получить информацию о производителе образцов гепарина. Кроме того, если производитель выпускает гепарин с различным происхождением, то

наблюдается формирование соответствующих кластеров внутри одного производителя. Показали, что анализ МГК ИК спектральных данных предоставляет информацию о происхождении и неорганическом катионе ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), входящем в состав соли гепарина.

4. Изучили влияние предварительной обработки ИК спектральных данных на показатели качества хемометрической модели. Установлено, что корректное проведение ПО ИК спектров позволяет значительно улучшить качество модели. Последовательное применение методов сглаживания, коррекции базовой линии, нормализации и 1-ой производной является наиболее оптимальным.

Работа выполнена в рамках научного проекта: грант РФФИ № 18-73-10009.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bjork, I. Mechanism of the anticoagulant action of heparin // Bjork, I., Lindahl, U. // *Mol. Cell. Biochem.* – 1982. – Vol. 48. – No. 3. – p. 161-182.
2. Linhardt, R. Heparin: Structure and activity / Linhardt, R. // *J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 46. – No. 13. – p. 2551-2564.
3. Beni, S. Analysis and characterization of heparin impurities / Beni, S., Limtiaco, J., Larive, C. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – No. 2. – p. 527-539.
4. Liu, H. Lessons learned from the contamination of heparin / Liu, H., Zhang, R., Linhardt, R. // *Nat. Prod. Rep.* – 2009. – No. 3. – p. 313-321.
5. Berg, J. Biochemistry, Eight Edition / Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G. [et al.] // W. H. Freeman and Company. – 2015. – p. 328.
6. Casu, B. Structure and biological activity of heparin / Casu, B. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 1985. – Vol. 43. – p. 51-134.
7. Walenga, J. Importance of a 3-O-sulfate group in a heparin pentasaccharide for antithrombotic activity / Walenga, J., Petitou, M., Samama, M. [et al.] // *Thromb. Res.* – 1988. – No. 6. – p. 553-563.
8. Guerrini, M. Orthogonal analytical approaches to detect potential contaminants in heparin / Guerrini, M., Zhang, Z., Shriver, Z. [et al.] // *PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – No. 40. – p. 16956-16961.
9. Volpi, N. Quantitative capillary electrophoresis determination of oversulfated chondroitin sulfate as a contaminant in heparin preparations / Volpi, N., Maccari, F., Linhardt, R. // *Anal. Biochem.* – 2009. – Vol. 388. – p. 140-145.
10. Volpi, N. Agarose-gel electrophoresis for the quality assurance and purity of heparin formulations / Volpi, N., Buzzega, D. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 67-68. – p. 144-147.
11. Wielgos, T. Determination of impurities in heparin by capillary electrophoresis using high molarity phosphate buffers / Wielgos, T., Havel, K., Ivanova, N. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – Vol. 49. – p. 319-326.
12. Somsen, G. Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan

- sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis / Somsen, G., Tak, Y., Torano, J. [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216. – p. 4107-4112.
13. Bendazzoli, C. Determination of dermatan sulfate and chondroitin sulfate as related substances in heparin by capillary electrophoresis / Bendazzoli, C., Liverani, L., Spelta, F. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 53. – p. 1193-1200.
  14. Keire, D. Analysis of crude heparin by <sup>1</sup>H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate / Keire, D., Trehy, M., Reepmeyer, J. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 51. – p. 921-926.
  15. Keire, D. Characterization of currently marketed heparin products: Key test for quality assurance / Keire, D., Ye, H., Trehy, M. [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 399. – p. 581-591.
  16. Thiangthum, S. Development and validation of an ion-exchange chromatography method for heparin and its impurities in heparin products / Thiangthum, S., Vander Heyden, Y., Buchberger, W. [et al.] // *J. Sep. Sci.* – 2014. – Vol. 37. – p. 3195-3204.
  17. Trehy, M. Analysis of heparin sodium by SAX/HPLC for contaminants and impurities / Trehy, M., Reepmeyer, J., Kolinski, R. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – Vol. 49. – p. 670-673.
  18. Nashii, N. Heparin identification test and putiry test for OSCS in heparin sodium and heparin calcium by weak anion-exchange high-performance liquid chromatography / Nashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S. [et al.] // *Biologicals.* – 2010. – Vol. 38. – p. 539-543.
  19. Fasciano, J. Ion chromatography for the separation of heparin and structurally related glycoaminoglycans: A review / Fasciano, J., Danielson, N. // *J. Sep. Sci.* – 2016. – Vol. 39. – p. 1118-1129.
  20. Workman, W. Quantitative Analysis of Impurities in Unfractionated Heparin of Bovine Origin / Workman, W., Carrick, K. // *Front. Med.* – 2020. – Vol. 6.

21. Brezillon, S. Glycosaminoglycan profiling in different cell types using infrared spectroscopy and imaging / Brezillon, S., Untereiner, V., Lovergne, L. [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – Vol. 406. – p. 5795-5803.
22. Mainreck, N. Rapid characterization of glycosaminoglycans using a combined approach by infrared and Raman microspectroscopies / Mainreck, N., Brezillon, S., Sockalingum, G. [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 100. – p. 441-450.
23. Devlin, A. Analysis of solid-state heparin samples by ATR-FTIR spectroscopy / Devlin, A., Mycroft-West, C., Guerrini, M., [et al.] // *BioRxiv.* – 2019.
24. Alban, S. Comparison of established and novel purity tests for the quality control of heparin by means of a set of 177 heparin samples / Alban, S., Luhn, S., Schiemann, S. [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 399. – p. 605-620.
25. Zang, H. Application of near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis in monitoring of crude heparin purification process / Zang, H., Wang, J., Zhang, H. [et al.] // 2013. – Vol. 109. – p. 8-13.
26. Spencer, J. Screening of heparin API by near infrared reflectance and Raman spectroscopy / Spencer, J., Kauffman, J., Reepmeyer, J. [et al.] // 2009. – Vol. 98. – p. 3540-3547.
27. Monakhova, Y. Retrospective multivariate analysis of pharmaceutical preparations using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Example of 990 heparin samples / Monakhova, Y., Diehl, B. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – Vol. 173. – p. 18-23.
28. Zang, Q. Combining <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics to identify heparin samples that may possess dermatan sulfate (DS) impurities or oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) contaminants / Zang, Q., Keire, D., Wood, R. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – Vol. 54. – p. 1020-1029.
29. Lima, M. A new approach for heparin standardization: combination of scanning UV spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance and Principal Component Analysis / Lima, M., Rudd, T., de Farias, E. [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6.

30. Mauri, L. Combining NMR spectroscopy and chemometrics to monitor structural features of crude heparin / Mauri, L., Marinozzi, M., Mazzini, G. [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – p. 1146.
31. Ouyang, Y. Chemometric analysis of porcine, bovine and ovine heparin / Ouyang, Y., Han, X., Yu, Y. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – Vol. 164. – p. 345-352.
32. Suzuki T. The establishment and validation of efficient assays for anti-IIa and anti-Xa activities of heparin sodium and heparin calcium / Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Hashii, N. [et al.] // *Biologicals*. – 2013. – Vol. 41. – p. 415-423.
33. Wold, S. Principal Component Analysis / Wold S., Esbensen, K., Geladi, P. // 1987. – Vol. 2. – p. 37-52.
34. Lee, L. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum / Lee, L., Liong, C., Jemain, A. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* – 2017. – Vol. 163. – p. 64-75.
35. Pomerantcev, A. Chemometrics in Excel / Pomerantcev, A. – USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. – 405 p.
36. Massart, D. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A / Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L. [et al.]. – Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 1997. – p. 436.
37. Grant, D. Infrared spectroscopy of heparins suggests that the region 750-950  $\text{cm}^{-1}$  is sensitive to changes in iduronate residue ring conformation / Grant, D., Long, W., Moffat, C. [et al.] // *Biochem.* – 1991. – Vol. 275. – p. 193-197.