© Коллектив авторов, 2020

Курсаков С.В.^{1,2}, Кузнецова Е.Г.¹, Курылева О.М.¹, Саломатина Л.А.¹,
Гурьянова С.В.^{3,4}, Борисова О.Ю.^{5,6}, Гудима Г.О.⁷, Севастьянов В.И.^{1,2}

Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокoeffективной жидкостной хроматографии

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, г. Москва, Российская Федерация

² Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий», 123557, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Медицинский институт, 117198, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, г. Москва, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Московский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 125212, г. Москва, Российская Федерация

⁶ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

⁷ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Для определения лекарственных средств пептидной природы широко используется метод обращенно-фазовой высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с градиентным режимом элюирования. Среди опубликованных работ не найдено валидированных методик, пригодных для исследования новых лекарственных форм глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП). В силу существенных недостатков градиентного элюирования при разработке методик ВЭЖХ-анализа рекомендуется избегать применения градиента, предпочитая ему изократическое элюирование.

Цель – разработка и валидация методики количественного определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах с использованием изократического режима элюирования. Эта методика может быть использована при разработке новых лекарственных форм ГМДП.

Материал и методы. Количественное определение ГМДП в растворах проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме на колонке Mediterranea Sea18 15×0,4 см, 5 мкм с использованием элюента состава: ацетонитрил, 25 мМ фосфатный буферный раствор (3:97), pH 7,3; скорости потока 0,7 мл/мин, длины волны детектора 200 нм и температуры термостатируемой колонки 25 °С.

Результаты. Разработанная методика валидирована по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость), промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность, аналитическая область, пригодность хроматографической системы. Методика успешно апробирована на лабораторных образцах транскермальных терапевтических систем, содержащих ГМДП.

Заключение. Разработана методика количественного определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с изократическим элюированием. Пригодность методики подтверждена соответствием основных валидационных характеристик критериям приемлемости. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,5–50 мкг/мл. Методика может быть использована в аналитической части доклинических исследований новых лекарственных форм ГМДП.

Ключевые слова: глюкозаминилмурамилдипептид; водные растворы; обращенно-фазовая ВЭЖХ; изократический режим элюирования

Для корреспонденции
Курсаков Сергей Васильевич –
старший научный сотрудник
ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И.
Шумакова» Минздрава России
Москва, Российская Федерация
E-mail: kursakov@mail.ru

Статья поступила 10.11.2019. Принята в печать 16.12.2019.

Для цитирования: Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курyleva О.М., Саломатина Л.А., Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Гудима Г.О., Севастьянов В.И. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Иммунология. 2020, 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kursakov S.V.^{1,2}, Kuznetsova E.G.¹, Kuryleva O.M.¹, Salomatina L.A.¹,
Guryanova S.V.^{3,4}, Borisova O.Yu.^{5,6}, Gudima G.O.⁷, Sevastyanov V.I.^{1,2}

Development and validation of method for glucosaminylmuramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high-performance liquid chromatography

¹ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, 123182, Moscow, Russian Federation

² Institute of Biomedical Research and Technology, 123557, Moscow, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russian Federation

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 117997, Moscow, Russian Federation

⁵ G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation

⁶ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), 117997, Moscow, Russian Federation

⁷ National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. For the determination of peptide-based drugs the reverse phase HPLC method with a gradient elution mode is widely used. Among the published works no validated methods suitable for the study of new dosage forms of glucosaminyl muramyl dipeptide (GMDP) were found. Due to the significant drawbacks of gradient elution, it is recommended to avoid the use of a gradient when developing methods for HPLC analysis, preferring isocratic elution to it.

The aim of the study is the development and validation of a method for the quantitative determination of glucosaminyl muramyl dipeptide in aqueous solutions using the isocratic elution regimen, which can be used in the development of new dosage forms of GMDP.

Material and methods. Quantitative determination of GMDP in solutions was carried out by reverse phase HPLC in isocratic mode on a Mediterranea Sea 18 15 × 0.4 cm, 5 μm column using an eluent of the composition acetonitrile: 25 mM phosphate buffer solution (3:97), pH 7.3; a flow rate of 0.7 ml/min; a detector wavelength of 200 nm; and a column thermostat temperature of 25 °C.

Results. The developed technique was validated by the following characteristics: specificity, linearity, correctness, repeatability (convergence), intermediate (laboratory) precision, analytical area, suitability of the chromatographic system. The technique has been successfully tested on laboratory samples of transdermal therapeutic systems containing GMDP.

Conclusion. A method has been developed for the quantitative determination of GMDP in aqueous solutions by reverse phase HPLC with isocratic elution. The suitability of the method is confirmed by the compliance of the main validation characteristics with the acceptance criteria. The confirmed analytical range of the method was 0.5–50 μg/ml. The technique can be used in the analytical part of preclinical studies of new dosage forms of GMDP.

Keywords: glucosaminylmuramyl dipeptide; aqueous solutions; reverse phase HPLC; isocratic elution mode

Received 10.11.2019. Accepted 16.12.2019.

For citation: Kursakov S.V., Kuznetsova E.G., Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Gudima G.O., Sevastyanov V.I. Development and validation of a method for glucosaminyl muramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high performance liquid chromatography. Immunology. 2020; 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Sergey V. Kursakov – Senior Researcher,
Academician V.I. Shumakov
Federal Research Center
of Transplantology and Artificial Organs,
Ministry of Health
of the Russian Federation,
Moscow, Russian Federation
E-mail: kursakov@mail.ru

Введение

Мурамилпептиды являются фрагментами грамположительных и грамотрицательных бактерий. Мурамилпептиды регулярно образуются в кишечнике в процессе жизнедеятельности комменсальной микрофлоры и оказывают эффекторное воздействие на клетки кишечного эпителия, регулируя иммунный гомеостаз не только мукозального слоя, но и всего организма [1]. Рецепторы мурамилпептидов – NOD2-белки – относятся к рецепторам врожденного иммунитета и обнаружены во всех клетках организма. Активация NOD2-рецепторов является необходимым условием как для поддержания толерантности к микроорганизмам, населяющим эпителий и слизистые, так и для формирования адекватного иммунного ответа на патогены [2, 3].

Глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) является одним из наиболее перспективных соединений мурамилпептидного ряда для применения в качестве иммуномодулирующих средств и адъювантов [4]. ГМДП относится к иммуномодуляторам последнего (III) поколения, активирует врожденный и адаптивный иммунитет и оказывает влияние на широкий спектр заболеваний как инфекционной природы [5], так и аллергических заболеваний [6], принимает участие в борьбе организма с опухолями [7], применяется в коррекции иммунодефицитных состояний [8], при псориазе [9], астме [10], оказывает противовоспалительное, репарационное, лейкопоэтическое [11], детоксицирующее и гепатопротекторное действие [12].

ГМДП зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств под торговым наименованием Ликопид® и выпускается в форме таблеток (регистрационное удостоверение № ЛС-001438). Высокая эффективность и безопасность применения ГМДП, подтвержденные результатами клинических испытаний [13], определяют перспективность разработки его новых лекарственных форм, что, в свою очередь, делает необходимым усовершенствование существующих или поиск новых методов детектирования ГМДП.

Для разделения лекарственных средств пептидной природы чаще используют обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), так как большинство анализов хорошо растворимы в водных подвижных фазах и ограниченно растворимы в неполярных растворителях [14–16].

В работе R. Frkanec, J. Tomašić [17] хроматографирование ГМДП предложено проводить на колонке Zorbax ODS C18, используя в качестве подвижной фазы смесь ацетонитрил : 50 mM ацетат аммония (pH 6,0) в градиентном режиме элюирования.

Разделение пептидов, в том числе ГМДП, осуществлено [18] на колонке C18 Vydac с использованием линейного градиента смеси ацетонитрил : 0,1 % водный раствор трифторуксусной кислоты при 214 нм. Колонка Hypersil C18 использована авторами [19] для определения ГМДП в режиме линейного градиента от 0 до 100 % 40 mM фосфата натрия (pH 4,0), содержащего 20 % метанола. Детектирование проводили при длине волны 202 нм.

Аналог ГМДП, содержащий С-концевой остаток Lys (GMDP-Lys), анализировали на колонке с обращенной фазой Ultrasphere ODS, элюируя 0,1 % аммоний-трифторацетатным буфером (pH 3,5) с градиентом концентрации метанола от 10 до 60 % [20]. Анализируемое соединение элюировалось в виде двух пиков, что объяснялось авторами наличием в растворе двух аномеров по свободному гликозидному гидроксилу. В работе [21] хроматограмма конъюгата GMDP-Lys (AzS), полученная на колонке с обращенной фазой в градиентном режиме, также содержала два пика аномеров ГМДП.

Для изучения динамического равновесия α - и β -аномеров ГМДП в водных растворах была использована обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке Nucleosil C18 с градиентным элюированием смесью 0,05 % раствора трифторуксусной кислоты и 80 % раствора ацетонитрила [22]. Исследование показало, что соотношение аномеров $\alpha : \beta$ в растворах зависит от продолжительности установления равновесия, природы растворителя и составляет 2,12 в воде при pH 3,7 и выдерживании раствора около 150 мин.

Препаративное разделение аномеров ГМДП позволило изучить их индивидуальные конформационные и биологические свойства [22]. α -Аномер преимущественно приобретает свернутую структуру, стабилизированную внутримолекулярными водородными связями CO $\cdots$ HN, и является биологически неактивной формой. Биологическая активность ГМДП определяется наличием β -аномера, который образует в водном растворе линейные структуры. Такая α - β -аномерная специфичность молекулы должна учитываться при разработке новых препаратов, содержащих ГМДП.

Описанные методы определения ГМДП использовались для исследования специфического связывания глюкозаминилмурамилпептидов с гистонами [18], очистки конъюгатов ГМДП [21], разделения продуктов ферментативной обработки ГМДП [19], изучения свойств аномеров [22] и т.д. Работ, описывающих условия определения ГМДП, пригодных для исследования новых лекарственных форм ГМДП, не выявлено.

Известные способы детектирования ГМДП в основном относятся к методу обращенно-фазовой хроматографии с градиентным режимом элюирования. Градиентное элюирование, как правило, применяется для проведения скрининговых измерений, а также анализов образцов, содержащих большое число целевых соединений [23]. Выбор между изократическим и градиентным режимами в пользу последнего представляется неоправданным для исследования лекарственных препаратов, содержащих одно или несколько действующих веществ, при условии достаточной селективности разделения основных и вспомогательных веществ. В силу известных недостатков градиентного элюирования [23] при разработке методик ВЭЖХ-анализа рекомендуется избегать применения градиента, предпочитая ему изократическое элюирование.

Целью настоящего исследования стали разработка и валидация методики количественного определения

ГМДП в водных растворах с использованием изократического режима элюирования, которая может быть использована при разработке новых лекарственных форм ГМДП, например, трансдермальной терапевтической системы (ТТС).

Материал и методы

Реактивы, материалы

В работе использовали субстанцию ГМДП (АО «Пептек», Россия), ацетонитрил, метанол, 2-пропанол, трифторуксусную кислоту, муравьиную кислоту, уксусную кислоту, фосфорную кислоту, калия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, аммония ацетат, 0,9 % раствор натрия хлорида.

Лабораторные образцы ТТС, содержащие 4,6 мг ГМДП, и лабораторные образцы ТТС, не содержащие ГМДП (плацебо), были изготовлены в асептических условиях «чистой комнаты» (производитель: отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России).

В экспериментах *in vitro* по изучению диффузии иммуномодулятора из ТТС были использованы кролики-самцы породы Новозеландский белый массой 2–2,5 кг, полученные из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо». После усыпления животного проводили забор лоскута кожи с предварительно удаленным волосным покровом в области живота, затем удаляли гиподерму. Усыпление проводили с использованием препаратов «Золетил 100» (Virbac Sante Animale, Франция) и «Рометар» (Bioveta, Чехия). Кожный лоскут использовали сразу после выделения. Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986]. Растворители имели квалификацию «для ВЭЖХ», реактивы – квалификацию не ниже «х. ч.».

Оборудование

Исследование проводили на хроматографической системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), снабженной вакуумным дегазатором G1322A, четырехканальным насосом G1311A, высокопроизводительным автосамплером G1367B, термостатом колонок G1316A, ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны G1314B.

Изучение чрескожной диффузии ГМДП из трансдермальной терапевтической системы проводили с использованием анализатора диффузии препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания).

Для пробоподготовки применяли электронные лабораторные весы AF-R220CE (Chinco Denshi Co., Япония), лабораторную центрифугу EBA 20 (Andreas Hettich GmbH, Германия), дозаторы переменного объема «Лен-пипет» 0,5–10, 5–50, 20–200 и 100–1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, Россия).

Методика пробоподготовки

Образцы, содержащие нерастворимые примеси, предварительно центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. При необходимости образцы разбавляли раствором элюента до концентраций, входящих в аналитический диапазон методики.

Условия хроматографического анализа

Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Mediterranea Sea 18 15 × 0,4 см, 5 мкм (Teknokroma Analitica SA, Испания), с предколонкой размером 8 × 4 мм, заполненной тем же сорбентом. Температура термостата колонки – 25 °С. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Подвижная фаза – смесь ацетонитрил : 25 мМ фосфатный буферный раствор (3 : 97), pH 7,3. Фосфатный буферный раствор готовили смешением 25 мМ раствора K_2HPO_4 с 25 мМ раствором KH_2PO_4 в соотношении 80 : 20. Элюент предварительно фильтровали и дегазировали на устройстве для фильтрования под вакуумом. Скорость потока подвижной фазы – 0,7 мл/мин.

Детектирование проводили при длине волны 200 нм, соответствующей максимуму поглощения ГМДП. Время хроматографирования – 10 мин, время удерживания аномеров ГМДП – около 3,3 и 4,9 мин.

Регистрация и обработка хроматографических данных выполнены с помощью программного обеспечения Chem Station (Agilent Technologies, США).

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 [24].

Результаты и обсуждение

Разработка метода

Целью этого этапа исследований стало определение оптимальных параметров хроматографического определения ГМДП в водных растворах. Основными критериями при выборе условий анализа служили простота предварительной подготовки проб и элюента, возможность использования изократического режима элюирования, качество основных валидационных характеристик, длительность анализа.

Хроматографирование проводили в режиме обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ с использованием неподвижных фаз различной полярности. В качестве компонентов элюента были изучены ацетонитрил, метанол, 2-пропанол, водные растворы трифторуксусной, муравьиной, уксусной, фосфорной кислот и их соли. Длину волны детектора варьировали в диапазоне 200–225 нм, pH элюента – с 2,0 до 7,5; температуру термостата колонки – от 20 до 60 °С.

Оптимальные параметры хроматографического разделения были получены в изократическом режиме на колонке Mediterranea Sea 18 15 × 0,4 см, 5 мкм (Teknokroma Analitica SA, Испания) при использовании элюента состава ацетонитрил : 25 мМ фосфатный

буферный раствор (3 : 97), pH 7,3; скорости потока 0,7 мл/мин, длины волны 200 нм и температуры термостата колонки 25 °С.

Предварительная подготовка проб заключалась в центрифугировании образцов, содержащих нерастворимые примеси, а также разбавлении до получения концентраций, входящих в аналитический диапазон методики.

Валидация методики

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [25] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость), промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность, аналитическая область, пригодность хроматографической системы.

Специфичность

Специфичность методики оценивали путем анализа модельных образцов: 0,9 % водного раствора хлорида натрия из приемной камеры диффузионной ячейки, этого же раствора с добавлением ГМДП до получения концентрации 25 мкг/мл и стандартного раствора ГМДП в 0,9 % водном растворе NaCl с концентрацией 25 мкг/мл. Пробы раствора отбирали из приемной камеры диффузионной ячейки, в которой был зафиксирован лоскут кожи кролика с прикрепленным плацебо ТТС, после термостатирования при температуре 32 °С при постоянном перемешивании 400 об/мин в течение 24 часов.

Полученные хроматограммы приведены на рис. 1–3.

Хроматограммы растворов ГМДП содержат два пика, что согласуется с данными [19–21] и может объясняться присутствием в растворе двух аномерных форм ГМДП. На хроматограммах холостых образцов 0,9 % раствора хлорида натрия из приемной камеры диффузионной ячейки не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания ГМДП. Таким образом, экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов и примесей не влияет на результат анализа.

Рис. 1. Хроматограмма 0,9 % водного раствора хлорида натрия из приемной камеры диффузионной ячейки

Линейность

Для оценки линейности анализировали 0,9 % растворы NaCl, содержащие 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150 мкг/мл ГМДП. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. По полученным значениям был построен градуировочный график зависимости суммарной площади пиков аномеров от концентрации ГМДП, приведенный на рис. 4.

Полученные значения площади пиков в диапазоне от 0,5 до 50 мкг/мл линейно зависят от концентрации; при концентрациях выше 50 мкг/мл линейная зависимость нарушается. В диапазоне от 0,5 до 50 мкг/мл угловой коэффициент b и свободный член a имеют значение 15,55 и -0,314 соответственно. Коэффициент корреляции r равен 0,9999, что удовлетворяет требованиям [25].

Правильность

Правильность валидируемой методики оценивали путем трехкратного анализа стандартных 0,9 % растворов хлорида натрия, содержащих 1, 25, 50 мкг/мл ГМДП. Согласно рекомендациям ICH [26], для оценки правильности использовали критерий обнаруживаемости определяемого вещества R , величина которого с учетом доверительного интервала должна находиться в пределах 98–102 %. Обнаруживаемость вычисляли по формуле:

$$R = \frac{\text{найденно аналита}}{\text{взято аналита}} 100 \%$$

Результаты оценки правильности методики представлены в табл. 1.

В диапазоне измерений 1–50 мкг/мл обнаруживаемость находится в интервале от 99,0 до 101,0 %, ее средняя величина составляет $99,8 \pm 0,7$ %, что соответствует критерию правильности методики.

Повторяемость (сходимость)

Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реакти-

Рис. 2. Хроматограмма 0,9 % водного раствора хлорида натрия из приемной камеры диффузионной ячейки, содержащего 25 мкг/мл ГМДП

Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора ГМДП ($C = 25$ мкг/мл) в 0,9 % водном растворе хлорида натрия

Рис. 4. Зависимость суммарной площади пиков ГМДП от концентрации

вов) в течение короткого промежутка времени. Результаты 6 параллельных испытаний растворов ГМДП приведены в табл. 2.

Относительное стандартное отклонение отдельных результатов не превышает 2,0 % и отвечает требованиям к методикам ВЭЖХ [27].

Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность методики изучали в условиях работы одной лаборатории. Анализ выполняли два исполнителя в разные дни на одном и том же оборудовании, результаты представлены в табл. 3.

Расчет F -критерия Фишера показал, что стандартные отклонения результатов анализов, полученных разными аналитиками, статистически эквивалентны. Средние результаты статистически достоверно не отличаются друг от друга ($p < 0,95$). Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность методики соответствует требованиям, предъявляемым к этой валидационной характеристике [27].

Аналитическая область

К величине аналитической области методик предъявляется следующее требование: методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики [25]. Поскольку содержание ГМДП в растворах после диффузии может изменяться в широких пределах в зависимости от состава ТТС и условий чрескожного переноса, аналитическую область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

Интервал концентраций ГМДП, в котором доказан приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности, составил 0,5–50 мкг/мл.

Оценка пригодности хроматографической системы

В соответствии с [28] для оценки пригодности системы проводили определение следующих параметров:

- эффективность хроматографической системы, рассчитанная по ширине пика на половине высоты;

Таблица 1. Результаты оценки правильности методики количественного определения ГМДП в водных средах ($n = 9$, $p < 0,95$)

Взято, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Открываемость, R , %
1	0,99	99,0
	0,99	99,0
	1,01	101,0
25	24,82	99,3
	24,91	99,6
	24,79	99,2
50	50,17	100,3
	50,18	100,4
	50,14	100,3
Среднее значение, %		99,8
Стандартное отклонение, SD , %		0,7
Относительное стандартное отклонение, RSD , %		0,7
Доверительный интервал среднего значения, %		99,1–100,5

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости методики количественного определения ГМДП в водных растворах ($C = 25$ мкг/мл, $n = 6$, $p < 0,95$)

Результат анализа, мкг/мл	Средний результат, мкг/мл	Стандартное отклонение, SD , мкг/мл	Относительное стандартное отклонение, RSD , %	Доверительный интервал среднего результата, мкг/мл
24,82	24,87	0,06	0,24	24,81–24,93
24,91				
24,79				
24,95				
24,85				
24,9				

- фактор асимметрии (фактор симметрии) пика, определенный по ширине пика на 5 % его высоты;
- разрешение между пиками аномерных форм ГМДП, рассчитанное с использованием ширины пиков на половине высоты;

Таблица 3. Результаты оценки промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики количественного определения ГМДП в водных растворах ($C = 25$ мкг/мл, $n = 6$, $p < 0,95$)

Исполнитель	Дата	Результат анализа, мкг/мл	Средний результат, мкг/мл	Стандартное отклонение, SD , мкг/мл	Относительное стандартное отклонение, RSD , %
Исполнитель 1	30.09.19	24,82	24,83	0,06	0,25
	30.09.19	24,91			
	30.09.19	24,79			
	01.10.19	24,74			
	01.10.19	24,82			
	01.10.19	24,89			
Исполнитель 2	15.10.19	24,82	24,85	0,07	0,27
	15.10.19	24,85			
	15.10.19	24,78			
	16.10.19	24,97			
	16.10.19	24,88			
	16.10.19	24,82			

Таблица 4. Основные параметры хроматографического анализа стандартного раствора ГМДП в 0,9 % водном растворе хлорида натрия ($C = 25$ мкг/мл, $n = 6$, $p < 0,95$)

Параметр	Значение	Требование [16, 18]
Эффективность хроматографической системы, число теоретических тарелок	7223 (пик 1) 4694 (пик 2)	Не менее 2000
Фактор асимметрии (фактор симметрии) пиков	1,25 (пик 1) 1,08 (пик 2)	0,8–1,5
Разрешение между пиками	7,6	Не менее 1,5
Относительное стандартное отклонение значений площади пиков, %	0,21 (пик 1) 0,17 (пик 2)	0,42

Таблица 5. Результаты оценки правильности методики определения ГМДП в условиях эксперимента *in vitro* ($n = 9$, $p < 0,95$)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Открываемость, R , %
200	201,6	100,8
	198,0	99,0
	200,0	100,0
210	211,1	100,5
	211,3	100,6
	211,2	100,6
280	283,9	101,4
	284,7	101,7
	284,1	101,5
Среднее значение, %		100,7
Стандартное отклонение, SD , %		0,8
Относительное стандартное отклонение, RSD , %		0,8
Доверительный интервал среднего значения, %		99,9–101,5

- относительное стандартное отклонение значений площади пика.

Основные параметры хроматографической системы рассчитывали из хроматограмм стандартного раствора ГМДП с концентрацией 25 мкг/мл после его 6-кратного анализа. Результаты определения представлены в табл. 4.

Полученные результаты доказывают пригодность хроматографической системы и разработанной методики для количественного определения ГМДП в водных растворах.

Проверка возможности использования методики для исследования чрескожной диффузии ГМДП *in vitro*

Разработанная методика ВЭЖХ-определения ГМДП в водных растворах была апробирована в ходе изучения его чрескожной диффузии из трансдермальной терапевтической системы.

Кожу кролика с прикрепленным лабораторным образцом ТТС, содержащим ГМДП, или образцом плацебо фиксировали между фланцами донорской и приемной камер диффузионной ячейки. Приемную камеру заполняли 0,9 % водным раствором хлорида натрия. Ячейку помещали в анализатор диффузии препаратов и термостатировали при температуре 32 °C и постоянном перемешивании со скоростью 400 об/мин. По истечении 24 часов отбирали пробы раствора из приемной камеры и анализировали по разработанной методике.

Правильность методики в условиях эксперимента *in vitro* оценивали методом добавок с использованием критерия открываемости определяемого вещества R . Для этого анализировали пробы раствора из приемной камеры ячеек с образцами ТТС, содержащими

ГМДП, до и после введения в пробы известного количества аналита. В качестве холостых проб использовали растворы из приемной камеры ячейек с образцами ТТС, не содержащими ГМДП. При необходимости анализируемые пробы разбавляли до концентраций, соответствующих аналитической области методики.

Результаты исследования представлены в табл. 5.

Отклонение результатов, полученных с использованием разработанной методики, от фактических значений не превышает 2 % и отвечает требованиям [26].

Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность применения предлагаемой методики для определения концентрации ГМДП в водных раство-

рах при проведении доклинических исследований новых лекарственных форм.

Заключение

Разработана методика количественного определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с изократическим элюированием. Пригодность методики подтверждена соответствием основных валидационных характеристик критериям приемлемости. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,5–50 мкг/мл. Методика может быть применена для проведения аналитической части доклинических исследований новых лекарственных форм и композиций с ГМДП.

■ Литература

1. Philpott D.J., Sorbara M.T., Robertson S.J., Croitoru K., Girardin S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (1): 9–23. DOI: 10.1038/nri3565.
2. Fritz J.H., Ferrero R.L., Philpott D.J., Girardin S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 2006; 7 (12): 1250–7.
3. Caruso R., Warner N., Inohara N., Núñez G. Immunity. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity.* 2014; 41 (6): 898–908.
4. Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62 (4): 174–8.
5. Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Коков Е.А., Андропова Т.М. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении atopических заболеваний. *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (1): 15–20.
6. Козлов И.Г., Воронина Е.В., Валякина Т.И., Симонова М.А., Гурьянова С.В., Мещерякова Е.А., Андропова Т.М. Липид в иммунотерапии опухолей: обзор экспериментальных исследований (обзор литературы). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2011; 10 (2): 32–8.
7. Лусс Л.В. Вторичные иммунодефицитные состояния у детей. Взгляд клинициста к назначению иммуномодулирующей терапии. *Аллергология и иммунология в педиатрии.* 2018; № 4 (55): С. 4–18.
8. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylinsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275–83. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.
9. Гурьянова С.В., Козлов И.Г., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует баланс Th1/Th2 при atopической бронхиальной астме. *Иммунология.* 2009; 30 (5): 305–8.
10. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К., Затолочина К.Э. Соединения на основе мурамилпептидов в современной медицине: фокус на глюкозаминилмурамилдипептид. *Терапевтический архив.* 2019; 12: 122–7.
11. Guryanova S., Andronova T., Kozlov I. The role of NOD2 ligands muramyl peptides in chemotherapy induced cytopenia. *Eur. J. Immunol.* 2019; 49 (suppl 3): 1229.
12. Иммуноотерапия : руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов, А.Е. Шульженко (ред.). Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018: 768 с. ISBN: 978-5-9704-4378-1.
13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Андропова Т.М. Отечественные иммуноотропные лекарственные средства последнего поколения и стратегия их применения. *Лечащий врач.* 1998. № 4. С. 46–51.
14. Aguilar M.-I. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods Mol. Biol.* 2004; 251: 3–9.
15. Mant C., Chen Y., Yan Z., Popa T., Kovacs J., Mills J., Tripet B., Hodges R. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol. Biol.* 2007; 386: 3–55. DOI: 10.1007/978-1-59745-430-8_1.
16. Carr D. A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC. Aberdeen : Advanced Chromatography Technologies, 2002: 64 p.
17. Frkanec R., Tomašić J. High performance liquid chromatography in analysis of compounds comprising the elements of bacterial peptidoglycan structure with immunological activity. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 2007; 31 (1): 107–33. DOI: 10.1080/10826070701665709.
18. Golovina T., Fattakhova G., Swiderek K., Makarov E., Bovin N., Shively J., Nesmeyanov V. Specific binding of glucosaminylmuramyl peptides to histones. *FEBS Lett.* 1999; 454 (12): 152–6. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00689-4.
19. Psylinakis E., Boneca I., Mavromatis K., Deli A., Hayhurst E., Foster S., Varum K., Bouriotis V. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (35): 30 856–63. DOI: 10.1074/jbc.M407426200.
20. Кайдалов А.А., Уткин Ю.Н., Андропова Т.М., Цетлин В.И., Иванов В.Т. Специфическое связывание мурамилпептидов с мембранами мозга крысы. *Биоорганическая химия.* 1987; 13 (11): 1523–9.
21. Golovina T.N., Sumaroka M.V., Samokhvalova L.V., Andronova T.M., Nesmeyanov V.A. Biochemical characterization of glucosaminylmuramyl dipeptide binding sites of murine macrophages. *FEBS Lett.* 1994; 356 (1): 9–12. DOI: 10.1016/0014-5793(94)01219-9.
22. Meshcheryakova E., Mineev K., Volynski P., Andronova T., Ivanov V. GMDP: unusual physico-chemical and biological properties of the anomeric forms. *J. Pept. Sci.* 2015; 21 (9): 717–22. DOI: 10.1002/psc.2796.
23. Сычев К.С. Практический курс жидкостной хроматографии. Кокоро, 2013: 272 с.
24. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Москва, 2018; 1: 289–318.
25. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Москва, 2018; 1: 276–88.
26. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). Geneva, 2005: 13 p.
27. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2004; 38 (4): 40–56.
28. ОФС.1.2.1.2.0001.15. Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Москва, 2018; 1: 845–72.

■ References

1. Philpott D.J., Sorbara M.T., Robertson S.J., Croitoru K., Girardin S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (1): 9–23. DOI: 10.1038/nri3565.
2. Fritz J.H., Ferrero R.L., Philpott D.J., Girardin S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 2006; 7 (12): 1250–7.

3. Caruso R., Warner N., Inohara N., Núñez G. Immunity, NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 2014; 41 (6): 898–908.
4. Manapova E.R., Fazylov V.Kh., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction in antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Voprosy virusologii*. 2017; 62 (4): 174–8. (in Russian)
5. Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kokov E.A., Andronova T.M. Clinical and immunological effectiveness and prospects of using muramyl dipeptides in the treatment of atopic diseases. *Meditsinskaya immunologiya*. 2016; 18 (1): 15–20. (in Russian)
6. Kozlov I.G., Voronina E.V., Valyakina T.I., Simonova M.A., Guryanova S.V., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M. Dycopide in tumor immunotherapy: a review of experimental studies (literature review). *Voprosy gematologii/oncologii i immunopatologii v pediatrii*. 2011; 10 (2): 32–8. (in Russian)
7. Luss L.V. Secondary immunodeficiency States in children. The Clinician's view on the appointment of immunomodulatory therapy. *Аллергология i immunologiya v pediatrii*. 2018; 55 (4): 4–18. (in Russian)
8. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylinsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275–83. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.
9. Guryanova S.V., Kozlov I. G., Meshcheryakova E.A., Alekseeva L.G., Andronova T.M. Glucosaminylmuril dipeptide normalizes the balance of TS1/Th2 in atopic asthma. *Immunologiya*. 2009; 30 (5): 305–8 (in Russian)
10. Ushkalova E.A., Zyryanov S.K., Zatulokina K.E. Connection on the basis of muramyl dipeptide in modern medicine: focus on glucosaminilmuramylpentapeptide. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2019; 12: 12–7. (in Russian)
11. Guryanova S., Andronova T., Kozlov I. The role of NOD2 ligands muramyl peptides in chemotherapy induced cytopenia. *Eur. J. Immunol.* 2019; 49 (suppl 3): 1229.
12. ISBN: 978-5-9704-4378-1. Immunotherapy: A guide for physicians. In: R.M. Khaitov, R.I. Ataulakhanov, A.E. Shulzhenko (eds). Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 768 p. ISBN: 978-5-9704-4378-1. (in Russian)
13. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Andronova T.M. Domestic immunotropic medicines of the last generation and their application strategy. *Lechashchiy vrach*. 1998; 4: 46–51. (in Russian)
14. Aguilar M.-I. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods Mol. Biol.* 2004; 251: 3–9.
15. Mant C., Chen Y., Yan Z., Pota T., Kovacs J., Mills J., Tripet B., Hodges R. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol. Biol.* 2007; 386: 3–55. DOI: 10.1007/978-1-59745-430-8_1.
16. Carr D. A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC. Aberdeen: Advanced Chromatography Technologies, 2002: 64 p.
17. Frkanec R., Tomašić J. High performance liquid chromatography in analysis of compounds comprising the elements of bacterial peptidoglycan structure with immunological activity. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 2007; 31 (1): 107–33. DOI: 10.1080/10826070701665709.
18. Golovina T., Fattakhova G., Swiderek K., Makarov E., Boivin N., Shively J., Nesmeyanov V. Specific binding of glucosaminylmuramyl peptides to histones. *FEBS Lett.* 1999; 454 (12): 152–6. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00689-4.
19. Psyllinakis E., Boneca I., Mavromatis K., Deli A., Hayhurst E., Foster S., Varum K., Bouriotis V. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (35): 30 856–63. DOI: 10.1074/jbc.M407426200.
20. Kaydalov A.A., Utkin Yu.N., Andronova T.M., Tsetlin V.I., Ivanov V.T. specific binding of muramyl peptides to rat brain membranes. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1987; 13 (11): 1523–9. (in Russian)
21. Golovina T.N., Sumaroka M.V., Samokhvalova L.V., Andronova T.M., Nesmeyanov V.A. Biochemical characterization of glucosaminylmuramyl dipeptide binding sites of murine macrophages. *FEBS Lett.* 1994; 356 (1): 9–12. DOI: 10.1016/0014-5793(94)01219-9.
22. Meshcheryakova E., Mineev K., Volynski P., Andronova T., Ivanov V. GMDP: unusual physico-chemical and biological properties of the anomeric forms. *J. Pept. Sci.* 2015; 21 (9): 717–22. DOI: 10.1002/psc.2796.
23. Sychev K.S. Practical course of liquid chromatography. Moscow: Kokoro, 2013. (in Russian)
24. OFP.1.0013.15. Statistical processing of chemical experiment results. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. Moscow; 2018; 1: 289–318. (in Russian)
25. OFP.1.1.0012.15. Validation of analytical methods. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. Moscow; 2018; 1: 276–88. (in Russian)
26. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). Geneva, 2005: 13 p.
27. Epshteyn N.A. Assessment of the suitability (validation) of HPLC methods in pharmaceutical analysis (review). *Khimikofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2004; 38 (4): 40–56. (in Russian)
28. OFP.1.2.1.2.0001.15. Chromatography. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. Moscow, 2018; 1: 845–72. (in Russian)