

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Общие принципы анализа

ОФС.1.7.2.0015.15

цитокинов и интерферонов

методом ВЭЖХ

Вводится впервые

Данная общая фармакопейная статья распространяется на анализ цитокинов и интерферонов методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Метод ОФ ВЭЖХ также используется для установления подлинности и определения содержания действующего вещества, специфических и неспецифических примесей группы цитокинов и интерферонов, а также ряда вспомогательных веществ, входящих в состав данной группы иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Метод обращенно-фазной ВЭЖХ

Принцип метода ОФ ВЭЖХ основан на распределении компонентов смеси между полярным элюентом и неполярными группами алкидных цепочек на поверхности сорбента. В условиях ОФ ВЭЖХ для цитокинов и интерферонов характерно наличие нескольких точек связывания с сорбентом, вследствие чего переход от прочной, почти полной сорбции вещества в неподвижной фазе к его преимущественному нахождению в подвижной фазе может быть очень резким. Постепенное увеличение силы элюента (например, повышение концентрации органического растворителя) может длительное время оставаться без видимого эффекта. Затем, при достижении критического значения элюирования, происходит быстрое перераспределение вещества в пользу подвижной фазы. В связи с этим анализ цитокинов и интерферонов методом ОФ ВЭЖХ проводят в условиях

градиентного элюирования, в процессе которого для каждого белка создаются условия быстрой десорбции.

Градиентное элюирование

Величина среднего фактора ёмкости (k), характеризующего удерживание сорбента в условиях градиентного элюирования, прямо пропорциональна продолжительности градиента и обратно пропорциональна разнице в содержании органического растворителя в начальной и конечной точках градиента. Для получения удовлетворительных значений k ($1 \leq k \leq 10$) для молекул белков цитокинов и интерферонов необходимо использовать разделение с продолжительным временем градиента и, по возможности, с меньшей разницей в содержании органического растворителя в начальной и конечной точках градиента. Как правило, продолжительность градиента в большинстве методик анализа цитокинов и интерферонов не превышает 60 мин.

Другим важным параметром является крутизна градиента – изменение процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе в единицу времени. В связи с тем, что в препаратах цитокинов и интерферонов наряду с основным действующим веществом содержатся, как правило, близкородственные примеси, нужно задавать необходимую пологую форму градиента (≈ 1 % в мин), которая позволяет обеспечить достаточно четкое разрешение пиков для определения чистоты препарата.

Выбор подвижной фазы. В обращённофазной хроматографии подвижная фаза состоит из буферного раствора и органического растворителя. При разделении белков и пептидов в состав растворов подвижной фазы, как правило, входят разбавленные растворы кислот: фосфорной, трифторуксусной, муравьиной, уксусной или гептафтормасляной.

В качестве органического компонента подвижной фазы при анализе белков и пептидов методом ОФ ВЭЖХ наиболее часто используется ацетонитрил, обладающий низкой вязкостью и низким поглощением в УФ

диапазоне с высоким разрешением и получением узких пиков правильной формы. Помимо ацетонитрила, в состав подвижной фазы могут входить метанол, пропанол и изопропанол. Детектирование пептидов и белков проводится по УФ-поглощению пептидной связи в диапазоне от 205 до 220 нм.

Выбор колонки. Наиболее часто для анализа пептидов и белков используются колонки с сорбентами на основе силикагеля с привитыми лигандами в виде прямоцепочечных алкильных групп (C_4 , C_8 , C_{18} и размером частиц не более 5 мкм), увеличение длины цепи которых увеличивает время удерживания определяемых компонентов.

Температура колонки. При испытании показателя подлинности лекарственных препаратов для получения воспроизводимых результатов времени удерживания анализируемых компонентов необходимо обеспечить термостатирование колонки с точностью $\pm (0,1 - 0,2) ^\circ C$.

Анализ вспомогательных веществ

Метод ОФ ВЭЖХ используется также для определения содержания в препаратах цитокинов и интерферонов таких вспомогательных веществ, как маннит, бензиловый спирт, *m*-крезол, полисорбат-80 и метионин. Все перечисленные вещества, за исключением метионина, анализируются в изократических условиях. Для анализа метионина используют режим градиентного элюирования.

Для анализа всех веществ, за исключением маннита, используются колонки, заполненные обращённофазными сорбентами C_{18} или C_8 с размером частиц 5 мкм и порами размером 60 – 120 Å. Для определения маннита используют колонку, заполненную силикагелем, к поверхности которого привиты лиганды, содержащие аминокгруппы.

При определении содержания маннита, полисорбата-80, *m*-крезола в качестве подвижной фазы используют смеси ацетонитрила или метанола в различной концентрации с водой. Для определения спирта бензилового используют смесь ацетонитрила (или метанол) с ацетатным буфером (pH

5,6).

Полисорбат-80 определяют по количеству образовавшейся в процессе щелочного гидролиза олеиновой кислоты или по суммированным пикам без дополнительной обработки лекарственного средства.

Для обнаружения всех вспомогательных веществ, за исключением маннита, используют УФ-детектор. При определении маннита применяют рефрактометрический детектор.

Условия проведения анализа (пробоподготовка, тип колонки, состав подвижной фазы, вид элюирования, способ детектирования, учёт и интерпретация результатов) должны быть изложены в фармакопейных статьях или нормативной документации.