

Стандартизация пептидного препарата тимоцин

Г. М. Бобизода¹, Н. Д. Бунятян², А. Н. Шахматов³

¹ Академия образования Республики Таджикистан, 734024, Душанбе, Таджикистан

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119991, Москва, Россия

³ ООО «Занд», Республика Таджикистан, Душанбе

Статья поступила 13.01.2016 г. Принята к печати 12.02.2016 г.

Резюме: В настоящее время установлено, что некоторые низкомолекулярные пептиды обладают иммуномодулирующей активностью и применяются в качестве пептидных препаратов. Одним из наиболее важных микроэлементов, играющих важную роль в функционировании иммунной системы, является цинк. Проведенные исследования послужили основой для разработки иммуностимулирующего препарата тимоцин, представляющего собой водный раствор координационных соединений цинка с дипептидом изолейцил-триптофан, который был зарегистрирован в Республике Таджикистан в качестве иммуномодулирующего препарата. Проведенные исследования позволили провести стандартизацию и разработать фармакопейную статью на стандартный образец и лекарственную форму иммуномодулирующего препарата тимоцин.

Ключевые слова: тимоцин; фармакопейная статья; стандартный образец.

Библиографическое описание: Бобизода ГМ, Бунятян НД, Шахматов АН. Стандартизация пептидного препарата тимоцин. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (1): 45–49.

В настоящее время установлено, что некоторые низкомолекулярные пептиды обладают иммуномодулирующей активностью и применяются в качестве пептидных препаратов [1]. Также известно, что некоторые микроэлементы играют важную роль в функционировании иммунной системы. Одним из наиболее важных микроэлементов в этом плане является цинк [2]. Как ранее [3] было показано на лекарственных препаратах органического происхождения, комплексообразование с ионами различных металлов приводит к увеличению специфической активности этих препаратов. Было обнаружено появление специфической активности энкефалинов при их комплексообразовании с ионом меди [4]. Было показано, что комплексообразование с ионами железа (II) и цинка приводит к повышению иммуностимулирующей активности у дипептида изолейцил-триптофан [5]. Эти исследования послужили основой для разработки иммуностимулирующего препарата тимоцин, представляющего собой водный раствор координационных соединений цинка с дипептидом изолейцил-триптофан [6], который был зарегистрирован в Республике Таджикистан в качестве иммуномодулирующего препарата. Тимоцин оказался эффективным при лечении различных заболеваний, сопровождающихся возникновением вторичных иммунодефицитных состояний [7, 8].

Целью данного сообщения является стандартизация и разработка фармакопейной статьи на тимоцин.

При создании лекарственной формы выбрано эквивалентное соотношение дипептида и иона металла при концентрации дипептида, как и в случае тимогена и тимогара, 100 мкг/мл. Лекарственная форма тимогена представляет собой 0,0157% водный раствор координационных соединений дипептида изолейцил-триптофан с ионом цинка.

Для стандартизации препарата на первом этапе было необходимо разработать стандартный образец тимогена.

Поскольку в состав тимогена входит дипептид изолейцил-триптофан, обладающий собственным поглощением в УФ-области спектра при 278 ± 2 нм, одним из методов, который можно применить для качественного и количественного определения тимогена, может стать УФ-спектрофотометрия.

В связи с тем, что координационные соединения цинка с дипептидом изолейцил-триптофан образуются в водном растворе (в процессе получения тимогена) без выделения в свободном виде, для разработки стандартного образца тимогена и методов его стандартизации было изучено влияние комплексообразования на интенсивность поглощения дипептида и на хроматографическую подвижность координационных соединений по сравнению с дипептидом.

Результаты спектрофотометрических исследований показали, что взаимодействие дипептида с ионом цинка не влияет на интенсивность поглощения дипептида при длине волны 280 ± 2 нм, используемой для его количественного определения.

Сложность выбора оптимальных условий хроматографирования пептидов обусловлена существованием в растворе катионной, цвиттер-ионной и анионной форм, отличных по времени удерживания — в результате хроматографический пик соединения расширяется, что неприемлемо при анализе препарата. Тимоцин представляет собой раствор координационных соединений дипептида H-Phe-Trp-OH с Zn^{2+} , существующих одновременно в нескольких комплексных формах, обусловленных ступенчатой диссоциацией дипептида [5].

Данных о влиянии соле- и комплексообразования на хроматографические свойства пептидов практически не имеется. Только В. С. Смирнов (2003) сообщал, что мононатриевая соль L-глутамил-L-триптофана по данным ТСХ и ВЭЖХ идентична дипептиду в выбранных условиях хроматографирования.

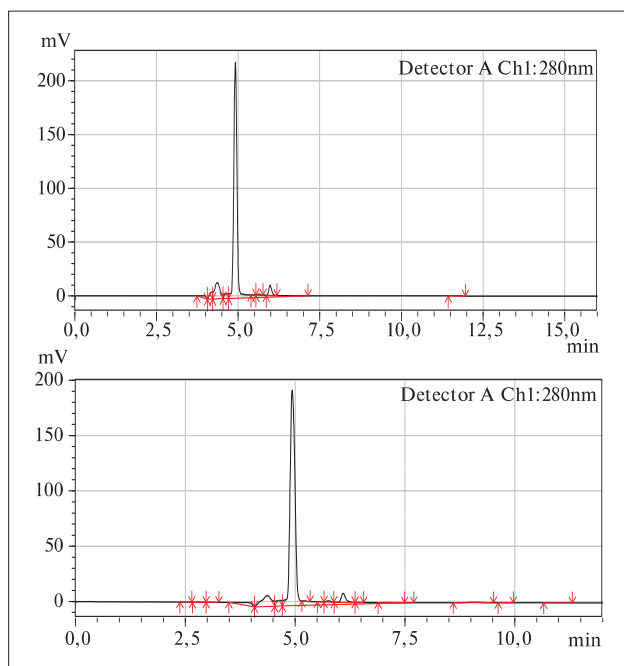


Рис. 1. ВЭЖХ хроматограммы дипептида изолейцил-триптофан (а) и его координационных соединений с цинком (б). Колонка Discovery C18 (25 см × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм), подвижная фаза: смесь ацетонитрила и фосфатного буфера (рН 7,4) (40:60), скорость потока составляла 1 мл/мин, детектирование проводили при длинах волн 254 и 280 нм и времени элюирования 30 минут

Первоначально методом ТСХ изучили влияние солеобразования на хроматографические свойства Н-Ие-Трп-ОН. При этом использовали свободный дипептид Н-Ие-Трп-ОН, хлоргидрат, ацетат, трифтороацетат, натриевую соль дипептида и его координационные соединения с цинком. Для смещения ионного равновесия дипептида в сторону образования одной ионной формы применили системы растворителей, содержащие как основные (пиридин), так и кислые реагенты (уксусная кислота): н-бутанол-пиридин-CH₃COOH-H₂O (30:20:6:24) (А), CH₃COOH-H₂O-CH₃ОН-CHCl₃ (7:3:1:1) (Б). Значения R_f вышеуказанных соединений в данных системах были одинаковы и равны 0,55 (А) и 0,88 (Б), свидетельствуя о существовании либо анионной (система А), либо катионной (система Б) формы дипептида.

При хроматографировании методом ВЭЖХ, для смещения равновесия в сторону одной ионной формы использовали элюент состава: ацетонитрил — фосфатный буфер с рН 7,4 (40:60). Фосфатный буфер должен обеспечить присутствие пептида в одной ионной форме. Результаты хроматографирования свободного дипептида и его солянокислой, ацетатной и натриевой солей, а также координационных соединений с ионом цинка показали, что в выбранных условиях все ионные формы пептида имели одинаковое время удерживания — 5,21 ± 0,15 минуты. Для примера на рис. 1 приведены ВЭЖХ хроматограммы дипептида Н-Ие-Трп-ОН и его координационных соединений с цинком.

Таким образом, применение кислых и основных систем при хроматографировании пептидов, их солей и координационных соединений методом ТСХ, а также применение фосфатного буфера (рН 7,4) при ис-

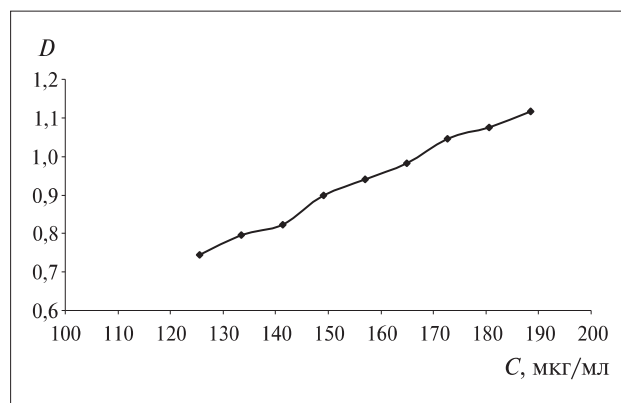


Рис. 2. График линейности метода количественного определения тимогина

пользовании ВЭЖХ позволяют получать хроматограммы исследуемых соединений в одной ионной форме. Проведенные исследования позволили разработать фармакопейные статьи на стандартный образец тимогина и его лекарственную форму. Параметры стандартизации стандартного образца и препарата приведены в таблице 1.

Для определения количественного содержания цинка в тимогине (после его экстракции из препарата) был разработан метод, основанный на образовании окрашенного соединения цинка с дитизоном, интенсивность окраски которого зависит от содержания цинка. Фотометрирование проводили при 538 нм. Содержание цинка определяли по калибровочной кривой.

Методики количественного определения тимогина и содержания цинка в тимогине спектрофотометрическим методом были валидированы по параметрам линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность.

График линейности количественного определения тимогина показан на рис. 2. В этом случае коэффициент корреляции составил 0,999, параметры линейной зависимости $Y_i = bX_i + a$ были равны $b = 0,00607$, $a = -0,0172$.

При изучении повторяемости величина относительного стандартного отклонения не должна превышать 2% и составила в нашем случае 0,58%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Воспроизводимость методики изучали 2 аналитика в 5 повторностях, критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Среднее его значение составило 1,14%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

При изучении правильности методики путем измерения количественного содержания тимогина в растворах, полученных путем добавления к исследуемому раствору необходимого количества стандарта с концентрациями 20, 40, 50, 60, 80, 100, 110 мкг/мл до получения окончательной концентрации 157 мкг/мл, средний процент восстановления находится в пределах от -101,08 до +101,72, среднее его значение составляет 100,15%, что соответствует необходимым требованиям.

Таким образом установлено, что методика легко воспроизводима, доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов. Она позволяет объективно оценивать качество тимопина.

В методику количественного определения цинка в тимопине входит стадия экстракции цинка раствором дитизона в четыреххлористом углеороде или хлороформе. Поэтому было необходимо провести валидацию стадии экстракции. Изучение влияния времени экстракции и растворителя на результат определения показало, что оптимальным временем экстракции является 2 мин. Растворитель не оказывает влияния на результат определения.

Затем были проверены остальные характеристики методики: линейность, сходимость и правильность.

График линейности методики количественного определения содержания цинка приведен на рис. 3.



Рис. 3. График линейности метода количественного определения тимопина

Таблица 1

ПАРАМЕТРЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ – ТИМОЦИН

Стандартный образец		Лекарственная форма	
Параметр	Метод определения и характеристика	Параметр	Метод определения и характеристика
Описание	Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок без запаха	Описание	Прозрачный бесцветный водный раствор без запаха
Растворимость (ГФ XII, ОФС 42-0049-07)	Растворим в воде, очень мало растворим в спирте 95%, практически нерастворим в хлороформе	Подлинность	Спектр поглощения препарата имеет максимум при 278 ± 2 нм и плечи при $273-275 \pm 2$ нм и $287-288 \pm 2$ нм
Подлинность Тимопин Ацетат-ион (ГФ XI, вып. 1, стр. 159) Цинк (ГФ XI, вып. 1, стр. 165)	Спектр поглощения имеет максимум при 278 ± 2 нм и плечи при $273-275 \pm 2$ нм и $287-288 \pm 2$ нм Раствор дает качественную реакцию на ацетат-ион Раствор препарата дает качественную реакцию на ион цинка с раствором калия ферроцианида	Прозрачность (ГФ XI, вып. 1, стр. 198)	Препарат должен быть прозрачным
pH (потенциометрически, ГФ XII, ОФС 42-0048-07)	От 5,5 до 6,8 для 0,016924%-ного раствора	Цветность (ГФ XI, вып. 1, стр. 194)	Препарат должен быть бесцветным
Прозрачность раствора (ГФ XII, ОФС 42-0051-07)	Раствор должен быть прозрачным	Посторонние примеси (ТСХ)	На хроматографических пластинках должны появиться только два темно синих пятна с совпадающими R_f
Цветность раствора (ГФ XII, ОФС 42-0050-07)	Раствор должен быть бесцветным	Механические включения	Не должно быть
Посторонние примеси (ВЭЖХ)	Содержание любой единичной примеси не более 0,9%, суммарное содержание примесей не более 2,0%	Стерильность (ГФ XI, вып. 2, стр. 187-193)	Препарат должен быть стерильным
Потеря в массе при высушивании (ГФ XI, вып. 1, с.176)	Не более 6%	Пирогенность (ГФ XI, вып. 2, стр. 183-185)	Препарат должен быть апиогенным
Удельный показатель поглощения	163,1-176,7	Токсичность (ГФ XI, вып. 2, стр. 182-183)	Препарат должен быть нетоксичным
		Количественное содержание: Тимопин (спектрофотометрия) Цинк (спектрофотометрия)	От 90 до 110% От 90 до 110%

Параметры линейной зависимости $Y_i = bX_i + a$ составляли $b = 0,01$, $a = 0,021$ и коэффициент корреляции составлял 0,999.

При определении сходимости методики величины на относительного стандартного отклонения находилась в пределах 0,584–0,869%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

При изучении правильности методики было показано что средний процент восстановления находится в пределах от –101,08 до +101,72, среднее его значение составляет 100,15%.

Проведенные исследования показали, что разработанная методика количественного определения содержания цинка в тимоцине по всем параметрам пригодна для практического применения.

Полученные результаты включены в фармакопейные статьи «Тимоцин. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42 Тj-00002–08» (Срок действия установлен с 2013 по 2018 гг.) и «Тимоцин образец стандартный. Фармакопейная статья ФС 42-Тj-0003–08» (Срок действия установлен с 2008 по 2013 гг.).

Таким образом, проведенные исследования позволили провести стандартизацию и разработать фармакопейную статью на стандартный образец и ле-

карственную форму иммуномодулирующего препарата тимоцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов ВГ, Хавинсон ВХ, Малинин ВВ. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука; 2000.
2. Кудрин АВ, Громова ОА. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. М: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
3. Крисс Е, Волченкова ИИ, Бударин ЛИ. Координационные соединения металлов с лекарствами — новые эффективные терапевтические агенты. Координационная химия 1990; **16**(1): 11–21.
4. Mrabet B, Jouini M, Huet J, Lapluye G. Potentiometric, colorimetric and spectroscopic study of copper (II) complex of leucine — enkephalin and tripeptides, containing tyrosine. J Clin et Phys-chim Biol. 1992; **89**(11–12): 2187–2205.
5. Бобиев ГМ, Бунятян НД, Саядян ХС, Саповский ММ. Иммуноактивные пептиды и их координационные соединения в медицине. М.: Русский врач; 2009.
6. Бобиев ГМ. Способ получения иммуностимулирующего препарата тимоцин. Патент Республики Таджикистан, № TJ 282; 1998.
7. Мансуров ХХ, Мироджов ГК, Мансурова ФХ, Бобиев ГМ, Холназаров БМ. Тимоцин в терапии хронических диффузных заболеваний печени. Проблемы гастроэнтерологии 2010; **1–2**: 40–49.
8. Мирзоева ДС, Бобиев ГМ, Анохина ИВ. Применение тимодина при лечении рака молочной железы. В кн.: VI съезд онкологов и радиологов стран СНГ. Материалы съезда: Душанбе, 1–4 октября 2010 г. Душанбе; 2010.

ОБ АВТОРАХ

Академия образования Республики Таджикистан. Республика Таджикистан, 734024 Душанбе, ул. Айни, 45.
Бобизода Гуломқодир Муқаммалович. Президент, д-р фарм. наук, проф.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова.
Российская Федерация, 119991, Москва, Трубецкая улица, 8, стр. 2.

Бунятян Наталья Дмитриевна. Заведующий кафедрой фармакологии с курсом технологии лекарств
факультета последиplomного профессионального образования провизоров, д-р фарм. наук, проф.

ООО «Занд». Республика Таджикистан, 734005, Душанбе, ул. А. Каххарова, 111.
Шахматов Александр Николаевич. Заведующий лабораторией, канд. хим. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Бунятян Наталья Дмитриевна; Bunyatyan@expmed.ru

STANDARDIZATION OF THE PEPTIDE PREPARATION TIMOCIN

G. M. Bobizoda¹, N. D. Bunyatyan², A. N. Shakhmatov³

¹ Education Academy of the Tajikistan Republic, 734024, Dushanbe, Tajikistan

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

³ «Zand Ltd», 734005, Dushanbe, Tajikistan

Abstract: It is currently established that some low molecular weight peptides possess immunomodulating activity and are used as peptide preparations. One of the most important trace elements playing an important role in the functioning of the immune system is zinc. The performed research became the basis for the development of the immunomodulatory preparation timocin, in a form of aqueous solution of zinc coordination compounds with dipeptide isoleucyl-tryptophan, which has been registered in the Republic of Tajikistan as an immunomodulating preparation. The research allowed to perform standardization and develop pharmacopoeia monograph for the reference standard and the finished dosage form of the immunomodulatory preparation timocin.

Key words: pharmacopoeia monograph; reference standard.

For citation: Bobizoda GM, Bunyatyan ND, Shakhmatov AN. Standardization of the peptide preparation timocin. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2016; (1): 45–49.

REFERENCES

1. Morozov VG, Havinson VH, Malinin VV. Peptide Thymomimetics. St. Petersburg, Nauka, 2000 (in Russian).
2. Kudrin AV, Gromova OA. Dietary elements in immunology and oncology. M: GEOTAR Media; 2007 (in Russian).
3. Kriss E, Volchenskova II, Budarin LI. Metal coordination compounds with drugs — new effective therapeutic agents. Koordinatsionnaya himiya 1990; **16**(1): 11–21 (in Russian).
4. Mrabet B, Jouini M, Huet J, Lapluye G. Potentiometric, colorimetric and spectroscopic study of copper (II) complex of leucine — enkeph-

- lin and tripeptides, containing tyrosine. J Clin et Phys–chim Biol. 1992; 89(11–12): 2187–2205.
5. Bobiev GM, Bunyatyan ND, Sayadyan HS, Sapovskiy MM. Immunoactive peptides and their coordination compounds in medicine. Moscow: Russkiy vrach; 2009 (in Russian).
 6. Bobiev GM. A method for producing an immunostimulatory drug Timocin. Patent of the Republic of Tajikistan, № TJ 282; 1998 (in Russian).
 7. Mansurov HH, Mirodzhov GK, Mansurova FH, Bobiev GM, Holnazarov BM. Timocin in the treatment of chronic diffuse liver diseases. Problemy gastroenterologii 2010; 1–2: 40–49 (in Russian).
 8. Mirzoeva DS, Bobiev GM, Anohina IV. Use of Timocin in the treatment of breast cancer. In: VI congress of oncologists and radiologists of CIS. Proceedings of the Congress: Dushanbe, 1–4 October 2010. Dushanbe; 2010 (in Russian).

AUTHORS

Academy of Education of the Republic of Tajikistan, Ayni street, 45, Dushanbe, 734024, the Republic of Tajikistan.

Bobizoda GM. President. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Street, 8/2, Moscow, 119991, Russian Federation.

Bunyatyan ND. Head of the Department of Pharmacology with a course of technology of medicines of the Faculty of post-graduate professional education of pharmacists. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

«Zand Ltd», A. Kahharov street, 111, Dushanbe, 734005, the Republic of Tajikistan.

Shahmatov AN. Head of laboratory. Candidate of Chemical Sciences.