

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ВЫСУШЕННОЙ КРОВИ МАРАЛА: ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ

К.П. Лунин*, В.Ф. Турецкова, доктор фармацевтических наук, профессор,
О.Г. Макарова, кандидат фармацевтических наук
Алтайский государственный медицинский университет;
Российская Федерация, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40

Введение. Адаптогенную активность высушенной крови марала связывают с аминокислотами. Анализ качественного и количественного состава аминокислот указанной субстанции проводится редко и с применением устаревших методик.

Цель работы – валидационная оценка разработанной ВЭЖХ-методики количественного определения основных аминокислот (аланин, лейцин, лизин) в высушенной крови марала.

Материал и методы. Объект исследования – высушенная кровь марала. Нативная кровь марала была заготовлена донорским методом во время срезки пантов у маралов-рогачей (май–июнь 2014 г.). Разработана методика, основанная на расщеплении пептидных связей белка раствором хлористоводородной кислоты с последующей модификацией получаемых аминокислот фенилизотиоционатом и дальнейшем разделении производных аминокислот методом ВЭЖХ. Валидационную оценку методики осуществляли по следующим характеристикам: специфичность, линейность, пригодность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости.

Результаты. Выявлено, что присутствие сопутствующих веществ не влияет на результаты анализа. Спектральные отношения, времена удерживания и максимумы поглощения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимых пределах. Установлена правильность и пригодность методики в условиях повторяемости, выявлена линейная зависимость величины аналитического сигнала от количества определяемого вещества.

Заключение. ВЭЖХ-методика количественного определения основных аминокислот крови марала (аланин, лейцин, лизин) соответствует рекомендуемым валидационным значениям и может быть использована для оценки качества высушенной крови марала.

Ключевые слова: высушенная кровь марала, пантогематоген, валидация, аминокислоты.

*E-mail: lunin.86@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на территории Алтайского края и Республики Алтай реализуются программы, направленные на развитие отрасли пантового оленеводства. Это обусловлено все большим интересом населения к охране здоровья, правильному и здоровому питанию, профилактике и ранней диагностике заболеваний с целью улучшения качества жизни.

Оценка качества высушенной крови марала (пантогематогена) и биологически активных добавок (БАД) на ее основе проводится в основном по содержанию включенных в их состав вспомогательных веществ, согласно техническим условиям фирм-производителей. Содержание действующих групп БАВ в выпускаемой продукции не определяется. Одной из перспективных и стабильных групп БАВ высушенной крови марала являются аминокислоты, с которыми связывают их адаптогенную активность. Однако анализ качественного и количественного состава аминокислот указанной субстанции проводится достаточно редко, причем, как правило, устаревшими методами [1].

Для оценки качества препаратов на основе продуктов пантового оленеводства кафедрой фармацевтической технологии Алтайского государственного медицинского университета (АГМУ) предложена методика с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), целесообразность применения которой для определения таких аминокислот, как глицин, пролин и аланин, была доказана на примере измельченных пантов марала. Методика основана на расщеплении пептидных связей белка хлористоводородной кислоты раствором с последующей модификацией получаемых аминокислот фенилизотиоционатом (ФИТЦ) и дальнейшем разделении фенилтиокарбамильных производных аминокислот [2].

Цель работы – валидационная оценка методики количественного определения основных аминокислот (лизин, лейцин, аланин) в высушенной крови марала методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемый объект – высушенная кровь марала (ООО «Пантопроект»), полученная методом вакуумной сушки. Заготовка нативной крови марала

осуществлялась донорским методом во время плановой срезки пантов у маралов-рогачей (май–июнь 2014 г.) [1].

Гидролизат получали по следующей методике: около 0,1 г (точная навеска) высушенной крови марала помещали в виалы, добавляли по 10 мл 6М раствора хлористоводородной кислоты. Герметично закупоренные виалы выдерживали в термостате при температуре 110°C в течение 16–18 ч. После охлаждения гидролизат фильтровали в коническую колбу со шлифом вместимостью 10 мл. 0,1 мл полученного раствора помещали в пробирку со шлифом и высушивали на водяной бане при температуре 65°C при разряжении, создаваемом водоструйным насосом. К высушенной аликвоте добавляли 0,1 мл 10,6% раствора натрия карбоната, 0,35 мл раствора ФИТЦ в изопропанол и 0,05 мл воды очищенной, выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре и высушивали в аналогичных условиях. К сухому остатку добавляли 1 мл воды очищенной, нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием (центрифуга ОПн 8УХЛ4.2) в течение 5 мин при скорости 10 000 об/мин [3, 4].

Исследования выполняли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence с УФ-детектором. Неподвижная фаза – хроматографическая колонка Perfect Chrom 100 C-18, 150×4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 нм с предколонкой Orbit 100 C-18, 2,6×4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 нм. Подвижная фаза: элюент А – ацетатный буфер 0,06 М (рН=5,5); элюент Б – ацетонитрил 100% + 1% изопропилового спирта; элюент

С – ацетатный буфер 0,06 М (рН=4,05). Хроматографировали в градиентном режиме при скорости потока подвижной фазы 130 мкл/мин и температуре колонки 55°C, объем пробы – 20 мкл. Детектирование осуществляли в УФ-области при длине волны 254 нм. В работе использовали стандартные образцы (СО) аминокислот: аланин, лейцин, лизин.

Содержание аминокислот (X) в процентах определяли с помощью метода абсолютной градуировки. Расчет проводили по формуле:

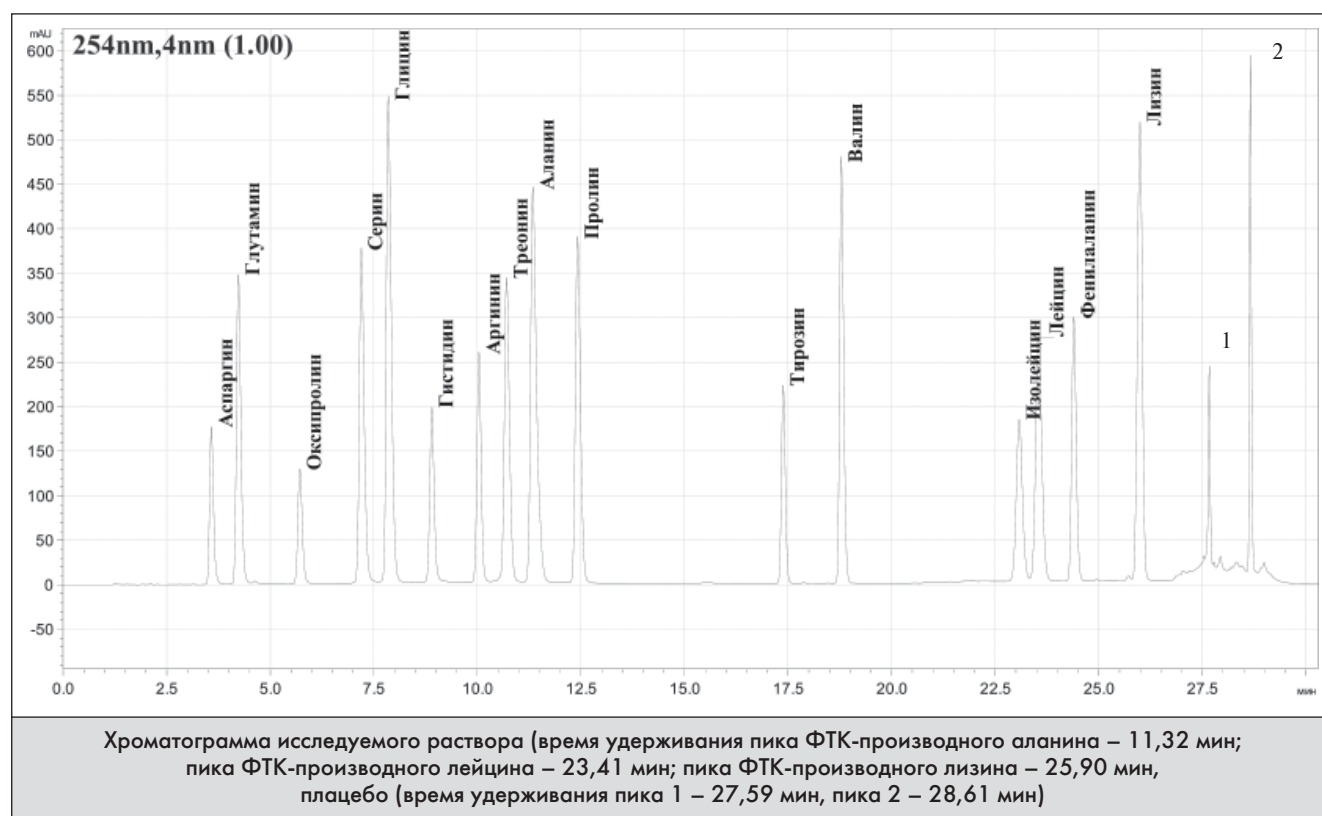
$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot m} \cdot 100\%$$

где С – массовая концентрация аминокислоты, мг/мл; V_1 – объем воды, мл; V_2 – объем аликвоты гидролизата пробы, мл; V_3 – объем 6 М раствора хлористоводородной кислоты, мл; m – масса навески, мг.

Валидационную оценку методики количественного определения аминокислот осуществляли по следующим показателям: специфичность, линейность, пригодность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости [5–8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность методики экспериментально устанавливали путем сопоставления результатов анализа образцов, содержащих сопутствующие вещества и СО. Как показали результаты анализа, присутствие сопутствующих веществ ни на что не влияет. Установлено (см. рисунок), что пики определяемых веществ



хорошо разделены между собой, не накладываются на пики примесей из растворителя и на пики вспомогательных веществ (плацебо).

Оценку специфичности методики проводили по временам удерживания и УФ-спектрам определяемых компонентов. Выявлено, что спектральные отношения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе ± 2 нм (табл. 1). Времена удерживания стандартных и анализируемых веществ не существенно отличались, а их стандартное отклонение не превышало нормы, указанной в технической документации прибора (0,5%). Максимумы поглощения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находились в допустимом пределе: ± 2 нм.

Пригодность хроматографической системы (ХС) определяли путем хроматографирования раствора СО и исследуемого раствора, после чего проверяли соответствие полученных результатов требованиям пригодности ХС по показателям: коэффициент асимметрии пика, критерии разделяющей способности ХС, коэффициент емкости, эффективность хроматографической колонки. Согласно полученным данным (табл. 2), вышеуказанная хроматографическая система может быть использована для анализа аминокислот в высушенной крови марала.

Установление показателя линейности проводили на 6 уровнях концентрации от теоретического содержания определяемого вещества, т.е. готовили растворы стандартных веществ в концентрациях 25, 50, 75, 100, 125 и 150% от номинального значения. После чего измеряли аналитический сигнал (площадь пика) для проб с различными концентрациями определяемого вещества. Выявлено, что зависимость величины аналитического сигнала (отклика) от количества опре-

деляемого вещества в пробе в диапазоне концентраций от 25 до 150% от номинального значения носит линейный характер. Коэффициент корреляции для всех определяемых веществ соответствовал рекомендуемому значению (не ниже 0,99).

Правильность методики оценивали путем измерения количественного содержания ФТК-производных

Таблица 1

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В КРОВИ МАРАЛА

Компоненты (ФТК-производные аминокислот)	Время удерживания ФТК-производных аминокислот, мин		Стандартное отклонение, %	
	исследуемый образец	стандартный образец	исследуемый образец	рекомендуемое значение
Аланин	11,32	11,31	0,007	Не более 0,5
Лейцин	23,41	23,53	0,084	
Лизин	25,90	25,99	0,064	

Таблица 2

ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ (ФТК-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ)

Компоненты	Коэффициент асимметрии пика, T	Коэффициент разделения пиков, Rs	Коэффициент емкости, k'	Эффективность хроматографической колонки т.т., N
<i>Стандартный образец</i>				
Аланин	1,25	2,99	8,08	27882
Лейцин	1,16	1,61	17,86	107315
Лизин	1,03	1,57	19,82	190683
<i>Исследуемый образец</i>				
Аланин	1,94	2,45	8,06	28519
Лейцин	1,34	1,52	17,79	87282
Лизин	1,05	1,51	19,84	134340
Рекомендуемые значения	T ≤ 2,0	Rs > 1,5	k' ≥ 2,0	N ≥ 1000

Таблица 3

ПРАВИЛЬНОСТЬ И ПРЕЦИЗИОННОСТЬ В УСЛОВИЯХ ПОВТОРЯЕМОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ (ФТК-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ)

Критерий валидации	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	аланин	лейцин	лизин	
<i>Правильность (результаты опытов с добавками)</i>				
Открываемость R, %	98,55–100,35	99,26–100,7	98,89–100,65	95–105
<i>Прецизионность в условиях повторяемости</i>				
Среднее значение (n=6), мг/мл	5,11	8,25	7,07	
Относительное стандартное отклонение RSD, %	1,25	1,12	1,26	RSD ≤ 2,0

аминокислот в растворах, полученных путем добавления необходимого количества СО аминокислот к исследуемому раствору до концентраций 115, 125, 150 и 175%. Прецизионность в условиях повторяемости устанавливали в одинаковых условиях одной лаборатории с учетом выполнения одним и тем же аналитиком, на одном и том же оборудовании и тем же набором реактивов. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения. Как показал анализ полученных данных (табл. 3), средний процент восстановления находится в требуемых пределах ($100 \pm 5\%$) и не выходит за пределы доверительного интервала. Относительное стандартное отклонение для каждого из действующих веществ не превышало 2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных валидационных исследований можно заключить, что ВЭЖХ-методика количественного определения основных аминокислот крови марала (аланин, лейцин и лизин) по показателям специфичности, пригодности, правильности, линейности и прецизионности соответствует рекомендуемым значениям и может быть использована для оценки качества высушенной крови марала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лунин К.П., Зверев Я.Ф., Турецкова В.Ф. Фармакологическая оценка перспективности разработки препарата общетонизирующего действия на основе крови марала. *Фундаментальные исследования*, 2014; 8: 115–8.
2. Земцова Н.П., Турецкова В.Ф., Макарова О.Г. Определение аминокислот в пантах марала: валидация методики. *Фармация*, 2016; 4: 38–41.
3. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М-02-902-142-07. (Электронный ресурс).
4. Лунин К.П., Земцова Н.П., Турецкова В.Ф. Сравнительный анализ качественного состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сборник научных трудов. Вып. 68. *Пятигорск*, 2013; 257–9.
5. Аладышева Ж.И., Беляев В.В., Береговых В.В. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик. *Фармация*, 2008; 7: 9–14.
6. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Государственный стандарт РФ «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» (Электронный ресурс).
7. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе. *Химико-фармацевтический журнал*, 2004; 38(4): 40–55.
8. Эпштейн Н.А., Емшанова С.В. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*, 2008; 42(11): 34–40.

Поступила 26 января 2017 г.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN THE DRIED BLOOD OF MARAL (*CERVUS ELAPHUS*): VALIDATION OF HPLC PROCEDURE

K.P. Lunin; Professor V.F. Turetskova, PhD; O.G. Makarova, PhD

Altai State Medical University; 40, Lenin Pr., Barnaul 656038, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. The adaptogenic activity of the dried blood of maral (*Cervus elaphus*) is associated with amino acids. The qualitative and quantitative compositions of amino acids in the above substance are analyzed rarely and using obsolete techniques.

Objective: to estimate the validation of the developed HPLC procedure for quantifying the main amino acids (alanine, leucine, and lysine) in the dried maral blood.

Material and methods. The object of the investigation included dried maral blood. Native blood from stags was sampled when cutting their antlers in May to June 2014. The investigators developed a procedure based on the cleavage of peptide bonds in hydrochloric acid with the subsequent modification of the resulting amino acids by phenylisothiocyanate and by the further HPLC separation of derivatives of amino acids. The validation of the procedure was assessed using the following characteristics: specificity, linearity, suitability, correctness, and precision during repeatability.

Results. It was found that the presence of accessory agents did not affect the results of an analysis. Spectral ratios, retention times, and absorption maxima of the substances analyzed in the test and standard samples were within the acceptance limits. The correctness and suitability of procedure during repeatability was established; a linear relationship between the magnitude of an analytical signal and the amount of a detectable substance was found.

Conclusion. The procedure for HPLC quantification of main maral blood amino acids, such as alanine, leucine, and lysine, corresponds to the recommended validation values and may be used to assess the quality of dried maral blood

Key words: dried maral blood, pantohematogen, validation, amino acids.

REFERENCES

1. Lunin K.P., Zverev Ya.F., Turetskova V.F. Pharmacological assessment of drug development prospect general tonic activity of red deer's blood. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2014; 8: 115–8 (in Russian).
2. Zemtsova N.P., Turetskova V.F. Makarova O.G. Determination of amino acids in Siberian stag antlers: validation of methods. *Farmatsiya*, 2016; 4: 38–41 (in Russian).
3. Fodder, mixed feed and mixed feed raw materials. Techniques for measuring mass fraction of amino acids through high performance liquid chromatography. M-02-902-142-07. (Electronic resource): URL: <http://www.gost.ru> (in Russian).
4. Lunin K.P., Zemtsova N.P., Turetskova V.F. Comparative HPLC assay of qualitative composition of amino acids in the blood and antlers of Siberian stag. Development, research info and marketing of new pharmaceutical products: In Abstracts. Issue 68. *Pyatigorsk*, 2013; 257–9 (in Russian).
5. Aladyшева Zh.I., Belyaev V.V., Beregovikh V.V. Practical aspects in the works on validation of analytical methods. *Farmatsiya*, 2008; 7: 9–14 (in Russian).
6. GOST R ISO 5725-1-2002. RF National Standard for validity (accuracy and precision) of measurement methods and their results. (Electronic resource): URL: <http://www.docload.ru> (in Russian).
7. Epstein N.A. Adaptability in pharmaceutical analysis. *Xhimiko-farmaceuticheskiy zhurnal*, 2004; 38(4): 40–55 (in Russian).
8. Epstein N.A., Emshanova S.V. On requirements of applicability of chromatography systems in controlling the quality of pharmaceutical substances and preparations with the help of HPLC techniques. *Xhimiko-farmaceuticheskiy zhurnal*, 2008; 42(11): 34–40 (in Russian).