

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ПАНТАХ МАРАЛА: ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Н.П. Земцова*, **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. Одной из обширных и стабильных групп БАВ пантов марала являются аминокислоты, с которыми связывают их адаптогенную активность. Для оценки качества пантов марала предложена методика (4) с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Цель работы – валидационная оценка разработанной ВЭЖХ-методики количественного определения основных аминокислот (глицина, аланина, пролина) в измельченных пантах марала.

Материал и методы. Объект исследования – измельченные панты марала, заготовленные во время плановой срезки пантов у маралов-рогачей в мае 2014 г. Измельчение сырья проводили на шаровой мельнице МШ-100. Гидролизат получали экстракцией 6M-раствором хлористоводородной кислоты с последующей модификацией аминокислот фенилизотиоционатом и дальнейшим разделением фенилтиокарбамильных производных аминокислот. Исследования выполняли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Япония) с УФ-детектором.

Результаты. Валидационную оценку методики осуществляли по следующим характеристикам: специфичность, линейность, пригодность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости. Установлено, 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. Согласно результатам исследования, методика правильна и пригодна в условиях повторяемости, выявлена линейная зависимость величины аналитического сигнала от количества определяемого вещества.

Заключение. Методика количественного определения аминокислот глицина, аланина, пролина методом ВЭЖХ по специфичности, пригодности, правильности, линейности и прецизионности в условиях повторяемости валидна и может быть рекомендована для оценки качества измельченных пантов марала.

Ключевые слова: панты марала, валидация, аминокислоты.

*E-mail: zemtsowa9@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Панты – молодые неокостеневшие ростки рогов оленей (марала, изюбра, пятнистого оленя), снятые весной на определенной стадии их бурного роста и развития. Панты используются для получения тонизирующих средств «Пантокрин» и «Ренарин». В настоящее время качество пантов марала и биологически активных добавок (БАД) на основе измельченных пантов марала контролирует-

ся по товароведческим показателям (ГОСТ 4227-76, ТУ), при этом биологическая активность и содержание основных групп биологически активных веществ (БАВ) не определяются [1, 2]. Одной из обширных и стабильных групп БАВ пантов марала являются аминокислоты, с которыми связывают их адаптогенную активность. Анализ качественного состава аминокислот и их количественного содержания в указанных субстанциях проводится достаточно редко, причем, как правило, с помощью устаревших методов [2].

Для оценки качества пантов марала предложена методика [4] с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), которая основана на расщеплении пептидных связей белка хлористоводородной кислотой с последующей модификацией получаемых аминокислот фенилизотиоционатом (ФИТЦ) и дальнейшем разделении фенилтиокарбамильных производных аминокислот.

Цель работы – валидационная оценка разработанной ВЭЖХ-методики количественного определения основных аминокислот (глицина, аланина, пролина) в измельченных пантах марала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемого объекта использовали измельченные панты марала, заготовленные ВЭПО «АСОХРА». Сырье заготавливали во время плановой срезки пантов у маралов-рогачей в мае 2014 г., после чего панты подвергали консервированию по традиционной методике и измельчению на шаровой мельнице МШ-100 до частиц размером от 1,0 до 0,1мм [2].

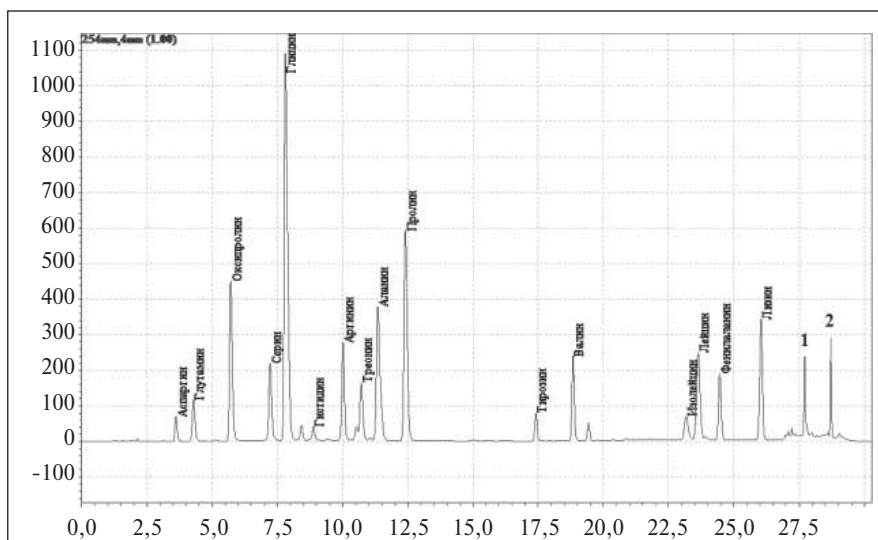
Методика получения гидролизата. Около 0,1 г (точная навеска) измельченных пантов марала помещали в виалы, добавляли по 10 мл 6 М раствора хлористоводородной кислоты. Герметично закупоренные виалы выдерживали в термостате при температуре 110°C в течение 16–18 ч. После охлаждения гидролизат фильтровали в коническую колбу со шлифом вместимостью 10 мл. В пробирку со шлифом помещали 0,1 мл полученного раствора 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 изопропанолу 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, не растворившийся осадок отделяли центрифугированием (центрифуга ОПн 8УХЛ4.2) в течение 5 мин при скорости 10 000 об/мин [3].

Исследования проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence («SHIMADZU», Япония) с УФ-детектором. Не-

подвижная фаза – хроматографическая колонка PerfectChrom 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 0,06М (рН=5,5); элюент Б – ацетонитрил 100% + 1% изопропилового спирта; элюент С – ацетатный буфер 0,06 М (рН=4,05). Хроматографирование проводили 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: глицин, аланин, пролин («Sigma», Германия).

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

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



Хроматограмма исследуемого раствора. Времена удерживания: пика ФТК-производного глицина – 7,80 мин; пика ФТК-производного аланина – 11,34 мин; пика ФТК-производного пролина – 12,39 мин), плацебо (пика 1 – 27,63 мин; пика 2 – 28,64 мин)

Таблица 1

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ПАНТАХ МАРАЛА

Компоненты (ФТК-производных аминокислот)	Время удерживания ФТК-производных аминокислот, мин		Стандартное отклонение, %	
	исследуемый образец	стандартный образец	исследуемый образец	рекомендуемое значение
Глицин	7,80	7,82	0,014	Не более 0,5
Аланин	11,34	11,31	0,021	
Пролин	12,39	12,39	0	

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидационную оценку методики количественного определения аминокислот осуществляли по следующим характеристикам: специфичность, линейность, пригодность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости [4–7].

Специфичность методики экспериментально устанавливали путем сопоставления результатов анализа образцов, содержащих сопутствующие вещества и СО. Согласно полученным данным, присутствие сопутствующих веществ не влияет на результаты анализа. Выявлено, что пики определяемых веществ хорошо разделены между собой, не накладываются на пики примесей из растворителя и на пики вспомогательных веществ (плацебо) – см. рисунок. Критерии оценки специфичности методики: времена удерживания и УФ-спектры определяемых компонентов (табл. 1).

Установлено, что спектральные отношения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе ± 2 нм (см. табл. 1). Времена удерживания анализируемых веществ не существенно отличаются от времени удерживания соответствующих стандартных образцов, а

стандартное отклонение не превышает 0,5% (нормы, указанной в технической документации прибора). Максимумы поглощения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе ± 2 нм.

Пригодность хроматографической системы (ХС) определяли путем хроматографирования раствора СО и исследуемого раствора, затем проверяли соответствие полученных результатов требованиям пригодности ХС по основным показателям: коэффициент асимметрии пика, критерии разделяющей способности ХС, коэффициент емкости, эффективность хроматографической колонки. Полученные результаты позволяют считать данную хроматографическую систему пригодной для анализа аминокислот в пантах марала (табл. 2).

Определение 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. Затем измеряли аналитический сигнал (площадь пика) для проб с различными концентрациями определяемого вещества. Показано, что зависимость величины аналитического сигнала (отклика) от количества определяемого вещества в пробе в диапазоне концентраций от 25 до 150% от номинального значения носит линейный характер. Коэффициент корреляции для всех определяемых ве-

Таблица 2

ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ (ФТК-ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ)

Критерий валидации	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	глицин	аланин	пролин	
Коэффициент асимметрии пика, T	1,82	1,55	1,37	$T \leq 2,0$
Коэффициент разделения пиков, Rs	2,42	2,08	2,58	$R_s > 1,5$
Эффективность хроматографической колонки т.т., N	14004	27776	41936	$N \geq 1000$
Коэффициент емкости, K'	5,27	8,12	8,97	$K' > 2,0$
Критерий воспроизводимости площадей пиков (n=6), RSD, %	0,49	0,81	0,92	$RSD \leq 2,0$

Таблица 3

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

Критерий валидации	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	глицин	аланин	пролин	
<i>Правильность (результаты опытов с добавками)</i>				
Открываемость R, %	98,13–101,86	93,77–102,41	97,44–102,07	95–105
<i>Прецизионность в условиях повторяемости</i>				
Среднее значение (n=6), мг/мл	6,32	2,74	4,33	
Относительное стандартное отклонение RSD, %	0,54	0,51	0,46	$RSD \leq 2,0$

шесть соответствовал рекомендуемым значениям (не ниже 0,99).

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания ФТК-производных аминокислот в растворах, полученных добавлением необходимого количества СО аминокислот к исследуемому раствору до концентраций 115, 125, 150 и 175%. Прецизионность в условиях повторяемости оценивали в одинаковых условиях в той же лаборатории, при выполнении одним аналитиком, на одном и том же оборудовании, с использованием одного и того же набора реактивов. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения. Согласно полученным данным (табл. 3), средний процент восстановления находился в требуемых пределах (100±5%) и не выходил за пределы доверительного интервала. Относительное стандартное отклонение для каждого из действующих веществ не превышало 2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемая ВЭЖХ-методика количественного определения глицина, аланина и пролина в измельченных пантах марала по специфичности, пригодности,

правильности, линейности и прецизионности в условиях повторяемости соответствует рекомендуемым значениям и может быть использована для оценки качества сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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 : сб.науч.тр. Вып.68. Пятигорск, 2013; 257–9.
2. Луницын В.Г. Производство, переработка и биохимический состав продукции пантового оленеводства. РАСХН, Сибирское отделение, ВНИИПО. Барнаул, 2008; 294.
3. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М-02-902-142-07. (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://www.gost.ru/>.
4. Аладышева Ж.И., Беляев В.В., Береговых В.В. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик. Фармация, 2008;7: 9–14.
5. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Государственный стандарт РФ «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://www.docload.ru/>.
6. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе. Хим.-фарм. журн., 2004; 38(4): 40–55.
7. Эпштейн Н.А., Емшанова С.В. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ. Хим.-фарм. журн., 2008; 42 (11): 34–40.

Поступила 28 января 2016 г.

DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN THE UNOSSIFIED ANTLERS OF MARAL (*CERVUS ELAPHUS*): VALIDATION OF A PROCEDURE

N.P. Zemtsova, Professor V.F. Turetskova, PhD; O.G. Makarova, PhD

Altai State Medical University; 49, Lenin Pr., Barnaul 656038, Russian Federation

SUMMARY

Background. Amino acids that are due to their adaptogenic activity are one of the extensive and stable groups of biologically active substances in the unossified antlers of maral (*Cervus elaphus*). A procedure (4) using high performance liquid chromatography (HPLC) has been proposed to assess the quality of unossified maral antlers.

Objective: to estimate the validation of the developed HPLC procedure for quantifying essential amino acids (glycine, alanine, and proline) in the crushed unossified maral antlers.

Material and methods. Crushed unossified maral antlers stored during the planned cutting of unossified stag antlers in May 2014 were the subject of the investigation. The raw material was crushed with a MSH-100 ball grinder. The hydrolysate was extracted with 6M hydrochloric acid, followed by amino acid modification with phenyl isothiocyanate and further separation of phenylthiocarbonyl derivatives of amino acids. The investigations were performed on a LC-20 Prominence liquid chromatograph (Japan) using an UV detector.

Results. The validation of the procedure was assessed using the following characteristics: specificity, linearity, suitability, correctness, and precision during repeatability. It was found that the presence of accessory agents did not affect the results of the analysis. Spectral ratios, retention times, and absorption maxima of the substances analyzed in the test and standard samples were within the acceptance limits. The investigation revealed that the procedure was proper and suitable during repeatability, as well as a linear relationship of the magnitude of an analytical signal to the amount of a detectable substance.

Conclusion. The procedure for HPLC quantification of amino acids, such as glycine, alanine, and proline, is valid in specificity, suitability, correctness, linearity, and precision during repeatability and may be recommended to assess the quality of crushed unossified maral antlers.

Key words: unossified maral antlers, validation, amino acids.

REFERENCES

1. 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).
2. Lunitsyn V.G. Manufacture and processing of antler-based reindeer breeding products and their biochemical composition. Siberian division of RAAS, VNIPO. Barnaul, 2008; 294 (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. (online resource); URL: <http://www.gost.ru/> (in Russian).
4. Aladysheva 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).
5. GOST R ISO 5725-1-2002. RF National Standard for validity (accuracy and precision) of measurement methods and their results. (online resource); URL: <http://www.docload.ru/> (in Russian).
6. Epstein N.A. Adaptability in pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical Chemistry, 2004; 38 (4): 40–55 (in Russian).
7. 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. Journal of Pharmaceutical Chemistry, 2008; 42 (11): 34–40 (in Russian).