

РАЗРАБОТКА ДОСТУПНОГО МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ α -АМИНОКИСЛОТ

А. А. Саламатов, А. В. Симонян, Ю. С. Покровская, А. А. Аванесян

Кафедра фармацевтической технологии и биотехнологии ВолГМУ

Для количественного определения α -аминокислот в лекарственном растительном сырье, лекарственных препаратах и биологических жидкостях разработаны разные методы [1, 3, 4, 5]. Несмотря на высокую точность, их применение ограничено длительностью приготовления рабочих растворов, их токсичностью (потенциометрическое титрование в неводной среде) и дороговизной оборудования (газожидкостная хроматография, аминокислотные анализаторы).

Ранее нами изучены спектральные характеристики продуктов реакции α -аминокислот с растворами нингидрина в различных растворителях (ацетон, диметилсульфоксид, вода) и установлено, что наиболее рационально проводить реакцию с нингидрином в водном растворе с последующим определением оптической плотности при длине волны 400 нм [2].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать точный и доступный метод количественного определения α -аминокислот в лекарственных препаратах и растительном сырье, основанный на нингидриновой реакции в водной среде.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалами для исследований служили α -аминокислоты, таблетки глицина, стандартный образец глицина, промышленные отходы яблок (шрот) и бобов какао (какаовелла). В ходе выполнения работы использовались методы экстрагирования, выделения и очистки полученных субстанций. Для разработки методики количественного анализа α -аминокислот в таблетках глицина и растительном сырье использовали 0,2 %-й раствор нингидрина в воде. Спектры поглощения продуктов реакции глицина, водных извлечений из шрота яблок и какаовеллы с раствором нингидрина определяли при длине волны 400 нм на спектрофотометре СФ-56 в кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами изучены спектральные характеристики продуктов реакции для 20 α -аминокислот с водным раствором нингидрина в диапазоне 350–600 нм. Проведенный анализ показал, что спектры поглощения имеют единый максимум при длине

волны (400±2) нм и в диапазоне длин волн 550–560 нм (рис. 1–4). Исключение составляют продукты реакции с цистеином, пролином и гистидином. Максимум поглощения для цистеина в видимой области смещен в 450 нм. Пролин – единственная α -аминокислота, в структуре которой отсутствует первичная аминогруппа, этим объясняется отсутствие характерного (при 400 нм) максимума поглощения в видимой области спектра. Однако в диапазоне 395–402 нм отмечается четкое плечо с достаточно интенсивным поглощением. Продукт реакции с гистидином имеет недостаточную интенсивность поглощения в видимой области спектра.

На основании анализа спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции установлено, что оптимальными условиями ее проведения являются: проведение реакции в водном растворе с последующим определением оптической плотности продукта реакции при длине волны 400 нм.

Нами проведена оптимизация условий нингидриновой реакции в водной среде: к 1 мл 0,1 %-го водного раствора α -аминокислоты прибавляют 1,1 мл 0,2 %-го свежеприготовленного водного раствора нингидрина и нагревают при температуре 120 °С в течение 20 мин (для лизина продолжительность реакции составляет 3–5 мин, т. к. более длительное нагревание приводит к разложению продукта реакции). Следует отметить, что наибольшая стабильность образующихся продуктов во времени наблюдается спустя 1 ч после начала реакции, а за последующие 30 мин интенсивность светопоглощения снижается на 2,9 %. Поэтому после полного охлаждения продукт реакции разбавляют водой до 100 мл и спустя 1 ч после начала реакции определяют оптическую плотность при длине волны 400 нм.

С целью изучения аналитических возможностей реакции нами проведено количественное определение глицина в таблетках.

На основании оптимизированных условий проведения реакции было подтверждено подчинение законам светопоглощения продукта взаимодействия стандартного образца глицина с 0,2 %-м водным раствором нингидрина в концентрации аминокислоты 0,005–0,025 мг/мл при длине волны 400 нм ($r = 0,999$). Стандартный образец глицина получен многократной дробной кристаллизацией фармакопейного глицина из спиртоводной смеси.

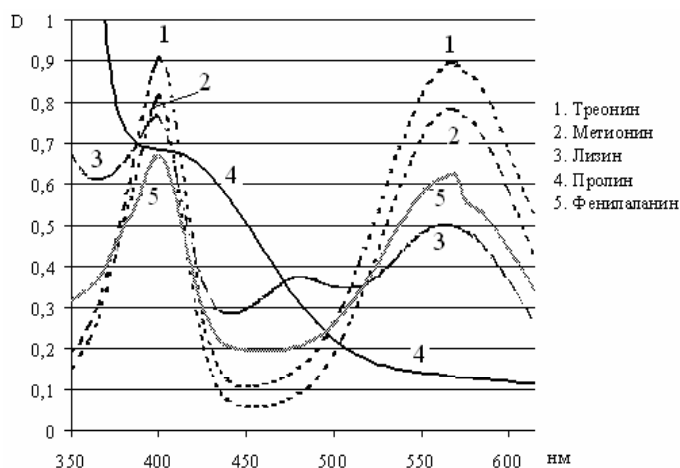


Рис 1. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 %-м водным раствором нингидрина

Рис 2. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 %-м водным раствором нингидрина

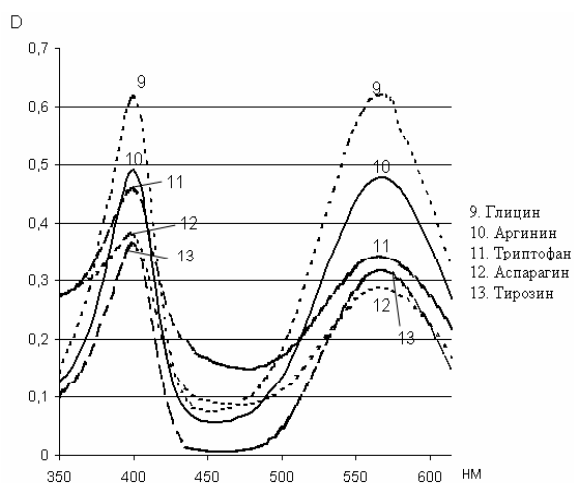


Рис 3. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 %-м водным раствором нингидрина

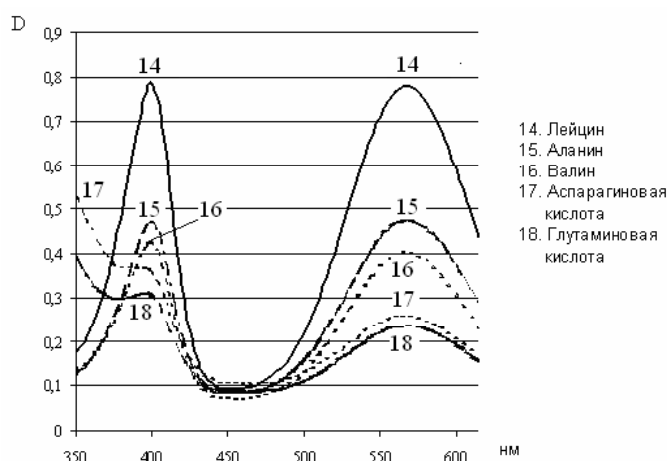


Рис 4. Спектры поглощения продуктов реакции α -аминокислот с 0,2 %-м водным раствором нингидрина

Для количественного анализа 0,1 г (точная навеска) порошка из 20 растертых таблеток помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в горячей воде, после охлаждения раствор доводили водой до метки и фильтровали через стеклянный фильтр № 3. К 1 мл полученного раствора прибавляли 1,1 мл 0,2 %-го водного раствора нингидрина и нагревали при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения раствор разбавляли водой до 100 мл и через 1 ч после начала реакции определяли оптическую плотность при длине волны 400 нм.

Параллельно проводили реакцию свежеприготовленного 0,1 %-го раствора стандартного образца глицина с 0,2 %-м водным раствором нингидрина и определяли оптическую плотность.

На основании проведенных испытаний (шесть определений) установлено, что содержание глицина в таблетках составляет 99,13 % (см. табл.). Полученный результат укладывается в допустимые нормы отклонений по содержанию глицина в таблетках (± 10 %) [3].

В следующем эксперименте нами разработан метод определения суммы аминокислот в растительном сырье – промышленных отходах яблок и бобов какао (какао-веллы), основанный на нингидриновой реакции.

Установлено, что продукт взаимодействия пролина с нингидрином при длине волны 400 нм характеризуется наибольшей стабильностью спустя 1 ч после реакции (за 20 мин интенсивность светопоглощения снижается на 0,2 %). Кроме того, установлено, что 1,0 г шрота яблок и какао-веллы после кислотного гидролиза содержат 0,0314 и 0,083 ммоль пролина соответственно, что незначительно превышает среднее молярное содержание α -аминокислот в исследуемом сырье (0,027 и 0,066 ммоль соответственно). Нами установлено, что продукт реакции пролина с 0,2 %-м водным раствором нингидрина подчиняется законам светопоглощения в концентрации пролина 0,016–0,072 мг/мл ($r = 0,997$). На этом основании количественное определение суммы аминокислот в исследуемых объектах можно проводить относительно пролина.

**Статистическая обработка метода количественного определения
 α -аминокислот в таблетках и растительном сырье**

Образец	f	$\langle x \rangle$, %	s^2	s	P, %	Δx	ε , %
Таблетки глицина	5	99,13	0,93575	0,9673	95	2,49	2,51
Шрот яблок	5	0,1703	$3,06 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-3}$	95	0,0045	2,64
Какаовелла	5	0,1907	$4,69 \cdot 10^{-6}$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	95	0,0056	2,9

Нами разработаны оптимальные условия выделения и очистки суммы аминокислот из растительного сырья. Кроме того, оптимизированы условия проведения нингидриновой реакции для количественного анализа α -аминокислот в исследуемых объектах.

Исходное сырье (шрот яблок, какаовелла) экстрагируется горячей водой. К полученному извлечению добавляется трехкратный объем 96 %-го этанола для осаждения балластных высокомолекулярных соединений и затем отстаивается в течение 10–12 ч при температуре 3–4 °С. Образующийся осадок отделяется центрифугированием, после чего извлечение сгущают до полного удаления спирта, перенося в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводя водой до метки. К 1,5 мл полученного водного извлечения добавляется 1,7 мл 0,2 %-го водного раствора нингидрина и нагревается при температуре 120 °С в течение 20 мин. После полного охлаждения продукт реакции необходимо разбавлять водой (2:1) и спустя 1 ч после начала реакции определять оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 400 нм. Параллельно проводится реакция свежеприготовленного 0,02 %-го раствора пролина с 0,2 %-м водным раствором нингидрина, после охлаждения продукт реакции разбавляется водой (2:1) и определяется оптическая плотность в аналогичных условиях. Следует отметить, что водные извлечения шрота яблок и какаовеллы

с нингидрином образуют стабильные продукты (за период 1–1,5 ч после начала реакции интенсивность светопоглощения снижается на 0,4 и 1,4 % соответственно).

Количественное содержание суммы аминокислот в образцах шрота яблок составило 0,17 %, какаовеллы – 0,19 % в пересчете на пролин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании изучения спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции и последующей оптимизации условий ее проведения разработан простой, доступный и точный метод количественного определения α -аминокислот в лекарственных препаратах и растительном сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. – М., 1991. – 544 с.
2. Симонян А. В., Саламатов А. А., Покровская Ю. С. и др. // Бюлл. ВНИЦ РАМН и АВО. – 2004. – № 2. – С. 27–29.
3. ФСП 42-0025265-02-99. Глицин таблетки сублингвальные 0,1 г. – 07.06.2002.
4. Шилова И. В., Краснов Е. А., Пяк А. М. // Хим.-фарм. журн. – 2002. – Т. 36, № 11. – С. 36–38.
5. Kuryt T., Sawnor-Corszynska D. // Acta chromatogr. – 2000. – № 10. – P. 97–103.

УДК:546.46:541.48:616-092.4

ОСОБЕННОСТИ ТРЕВОЖНОГО ПОВЕДЕНИЯ У КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛИМЕНТАРНОГО ДЕФИЦИТА МАГНИЯ И ИХ КОРРЕКЦИЯ

М. В. Харитонова, М. С. Кравченко, А. А. Желтова

НИИ фармакологии и кафедра фармакологии ВолГМУ

Существует мнение, что нарушение гомеостаза магния в организме играет немаловажную роль в патогенезе многих психических заболеваний, симптомами которых являются депрессия и повышенная тревожность [5, 9, 10]. Более того, после терапии магнием наблюдается стабилизация настроения у пациентов с биполярными расстройствами [2].

Согласно литературным данным, различные соли магния обладают разной биодоступностью [4, 8], которая может повышаться при комбинации солей с пиридоксином. При исследовании скорости компенсации алиментарного дефицита магния неорганическими и органическими солями магния [7] было показано, что наиболее активными в этом отношении из органических со-