

Экспериментальный анализ витаминого состава препарата «Лаеннек»

Проведено исследование плацентарного мультикомпонентного препарата «Лаеннек» с целью определения его витаминного состава. Витамины являются обязательной составляющей комплексных программ ухода за кожей и ее омоложения; причем витамины не только включаются в составы косметических препаратов, но и назначаются в виде инъекций и для приема внутрь.

Для оценки содержания витаминов в препарате «Лаеннек» использовались иммунологические методы и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Исследование показало устойчивое содержание в препарате «Лаеннек» цианокобаламина, витаминов D, K, C, E, B₆ и B₁. Установленные соотношения «микроэлемент/микроэлемент» и «микроэлемент/витамин» соответствуют таковым в физиологических системах, что подтверждает деликатность технологического процесса производства препарата.

Ключевые слова: Лаеннек; цианокобаламин; фолаты; витамин D₃; витамин K; альфа-токоферол; пиридоксин; тиамин; витамин C; цинк

А.В. Гилельс¹

О.А. Громова²

И.Ю. Торшин³

А.Ю. Волков⁴

И.В. Томилова⁵

¹ **Гилельс Анжелика Владимировна**, биолог, биохимик, научный руководитель корпорации RHANA, Москва
E-mail: gilels@rhana.ru

² **Громова Ольга Алексеевна**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе Российского спутникового центра Института микроэлементов ЮНЕСКО, Москва
E-mail: unesco.gromova@gmail.com

³ **Торшин Иван Юрьевич**, к.х.н., зав. лабораторией системной и вычислительной биологии ВЦ РАН, научный консультант Российского спутникового центра Института микроэлементов ЮНЕСКО, Москва
E-mail: unesco.tyu136@gmail.com

⁴ **Волков Андрей Юрьевич**, ст. научный сотрудник кафедры клинической лабораторной диагностики Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва
E-mail: rsmi@rsmi.ru

⁵ **Томилова Ирина Константиновна**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии Ивановской государственной медицинской академии Минздрава России, г. Иваново
E-mail: dpf@isma.ivanovo.ru

ВВЕДЕНИЕ

Сложность составов препаратов на основе природных экстрактов существенно затрудняет оценку их фармакокинетики и фармакодинамики. В то же время именно комплексность ингредиентов является гарантом разностороннего фармакотерапевтического воздействия препарата на организм человека на молекулярном уровне. Поэтому изучение качественного и количественного состава лекарственных средств природного происхождения, изготавливаемых с использованием современных молекулярно-биологических технологий, имеет важное значение для фармакотерапии самых различных заболеваний.

Мультикомпонентный препарат на основе гидролизата плаценты «Лаеннек» (Japan Bioproducts Industry, Япония) показывает высокую терапевтическую эффективность в различных областях медицины, включая эстетическую и анти-эйдж медицину [1, 2, 3]. «Лаеннек» используется врачами многих стран мира для лечения 80 различных нозологий, в том числе аденомы предстательной железы, климактерических расстройств, аллергических дермати-

тов, бессонницы, нарушений обмена веществ, в программах коррекции эстетических дефектов кожи. В России он зарегистрирован как гепатопротектор и иммуномодулятор.

«Лаеннек» производится по GMP-стандарту с использованием многоступенчатого молекулярного фракционирования, позволяющего удалять все белковые и небелковые продукты с молекулярным весом более 100 кДа.

Для понимания механизмов действия препарата на организм человека в целом и на кожу в частности необходимо экспериментальное изучение его ингредиентов. Раннее нами были исследованы пептидный, аминокислотный, макро- и микроэлементный составы «Лаеннека», что позволило сделать выводы о высокой степени его очистки от токсичных и условно токсичных микроэлементов (МЭ) [4, 5]. Важно, что исследование выявило наличие в составе препарата стабильных количеств цинка: отклонения по содержанию Zn в исследованных образцах не превышали 15%. Цинк является эссенциальным кофактором белков и пептидов, входящих в состав «Лаеннека». Отмечена стабильность содержания других МЭ, что указывает, во-первых, на высокую стандартизацию технологического процесса производства продукта и, во-вторых, на эффективность программы подготовки доноров.

Цель настоящей работы — анализ содержания витаминов в составе препарата «Лаеннек». Механизмы реализации гепатопротекторной, иммуномодулирующей, регуляторной и регенеративной функций «Лаеннека» обусловлены в основном наличием в его составе многочисленных факторов роста (инсулиноподобного, гепатоцитов, фибробластов и др.) [2]. Тем не менее анализ витаминного состава также имеет важное значение. Во-первых, многие витамины характеризуются выраженным гепатопротекторным и иммуномодулирующим эффектами [4]. Во-вторых, наличие даже следовых количеств витаминов позволяет сделать некоторые выводы о технологии производства препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали препарат «Лаеннек» — 5 ампул по 2 мл, серий № 0Y3100, 99199, 99191, со сроком годности до 08.2013 — в 5-кратном разбавлении бидистиллированной и деионизированной водой. Всего было получено 10 образцов, по 1 мл препарата «Лаеннек» в каждом.

Определение содержания витаминов

Изучение витаминного состава проводилось с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и различных методов детекции витаминов на выходе хроматографической колонки.

Количественное содержание витаминов определяли на жидкостных хроматографах Agilent 1100 и Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Процесс анализа пробы препарата делился на 2 этапа: 1-й — разделение пробы на составляющие компоненты; 2-й — детектирование и измерение содержания каждого компонента.

Для анализа содержания в препарате витаминов использовали бинарную ВЭЖХ-систему, инжектор, программированный флуориметрический детектор. Объем вкола сэмплера составил 25–50 мкл, температура колонки — 25°C, параметры флуориметрического детектора: старт — EX 320 нм, EM 415 нм; через 4 мин. — EX 367 нм, EM 435 нм.

Идентификация витаминных соединений в препарате осуществлялась по времени их удерживания. Количественное содержание каждого из компонентов рассчитывали, исходя из величины аналитического сигнала, измеренного с помощью детектора, подключенного к выходу хроматографической колонки. Применение флуориметрического детектора позволяет не только снизить пределы обнаружения, но и селективно выделить анализируемые вещества на фоне матричных и сопутствующих компонентов пробы.

Исследование концентраций витаминов А, Е, D, С и липоевой кислоты производили методом ВЭЖХ с УФ-спектрометрическим детектированием [8, 10, 14, 15]; витаминов В₁ и В₆ — с флуориметрическим детектированием [13, 11]. Содержание витаминов В₅ и К определяли методом ВЭЖХ с последующей масс-спектрометрией [16, 9], фолатов и витамина В₁₂ — иммунологическим методом [10].

Масс-спектрометрическое исследование элементного состава препарата

Для корреляционного анализа был установлен микроэлементный состав исследованных образцов препарата. При проведении масс-спектрометрии в качестве внутреннего стандарта в растворы вводили индий в концентрации 25,0 мкг/л. Калибровочные растворы были приготовлены из стандартных растворов компании VTRC с известным содержанием в диапазоне от 5,0–1000,0 мкг/л. Полученные растворы анализировали на масс-спектрометре с ионизацией в индуктивно-связанной плазме Plasma Quad PQ2 Turbo (VG, Великобритания). Рабочая мощность СВЧ-генератора составляла 1,3 кВт. Расход плазмообразующего газа (аргона) — 14,0 л/мин., расход транспортирующего газа — 0,89 мл/мин. Проводили по 3 экс-

Таблица 1

Содержание различных витаминов в исследованных образцах препарата «Лаеннек»

Витамины	Ед. измер.	Количество в 1 мл препарата «Лаеннек» (M±m)	Отношение m/M	Количество в 10 мл препарата «Лаеннек»	РСР*	Ед. измерения	% от РСР**
Фолаты	мкг/мл	0,25±0,14	0,55	2,45±1,36	400,0	мкг/сут.	0,61
Цианокобаламин (вит. В ₁₂)	мкг/мл	0,29±0,11	0,36	2,94±1,06	3,0	мкг/сут.	98,0
25(ОН)D***	нг/мл	7,71±0,67	0,09	77,0±7,0	10,0	мкг/сут.	0,77
Витамин В ₁	мкг/мл	3,13±0,60	0,19	31,00±6,0	1500,0	мкг/сут.	2,09
Витамин В ₅	мкг/мл	2,35±0,37	0,16	23,00±3,7	5,0	мг/сут.	0,47
Витамин С	мкг/мл	133,0±11,0	0,08	1330,0±110,0	90,0	мг/сут.	1,48
Витамин К	мкг/мл	0,60±0,08	0,14	6,0±0,8	120,0	мкг/сут.	5,00
Ретинол	мкг/мл	1,20±0,22	0,19	12,0±2,2	900,0	мкг/сут.	1,34
Витамин Е	мкг/мл	17,0±3,0	0,19	170,0±30,0	15,0	мг/сут.	1,13
Витамин В ₆	мкг/мл	6,70±1,16	0,17	67,0±12,0	2000,0	мкг/сут.	3,35

Примечание:

* РСР — рекомендуемое суточное потребление витамина (в соответствии с нормами РФ от 2008 г.);

** % РСР — процент от рекомендуемой нормы потребления;

***25(ОН)D — активная форма витамина D.

позиции каждого образца, время интегрирования сигнала — 60,0 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования витаминного состава образцов препарата «Лаеннек» были получены средние значения содержания различных витаминов в 1,0 мл препарата в каждой из 5 ампул. Был проведен расчет содержания витаминов в 10,0 мл «Лаеннека», то есть в дозе, рекомендуемой для внутривенного капельного введения данного препарата (табл. 1).

Проведенный анализ показал, что большинство витаминов присутствуют в составе препарата в количествах, не превышающих 5% от рекомендуемого суточного потребления. Однако содержание цианокобаламина в разовой дозе препарата — 2,94±1,06 мкг — соответствовало в среднем суточной норме его потребления, которая составляет 3,0 мкг/сут. (табл. 2), что является важным результатом исследования.

Разброс значений при определении содержания каждого из витаминов не превышал 19%. Такие достаточно четкие рамки содержания витаминов в препарате на основе природного экстракта свидетельствуют о высокой степени стандартизации технологического процесса при производстве «Лаеннека».

Установлено, что все витамины, за исключением цианокобаламина, содержатся в препарате в следовых количествах, из них в максимальных — витамин К (6,0±0,8 мкг в 10 мл, 5% от суточной потребности) и витамин В₆ (67,0±12,0 мкг в 10,0 мл, 3,4% от суточной потребности). Тем не менее наличие даже следовых количеств указывает на то, что технология производства препарата исключает разрушительные для витаминов воздействия (повышенную температуру, кислотность, высокие уровни оксидантов, таких как кислород, пероксиды и т.д.). Применение щадящего технологического режима позволяет сохранить в процессе производства препарата биологическую актив-

Таблица 2

Анализ содержания цианокобаламина в исследованных образцах (на 1 мл препарата)

Проба	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Среднее по 10 образцам (M±m)
Содержание В ₁₂ , мкг/мл	0,41	0,23	0,22	0,15	0,15	0,34	0,32	0,34	0,47	0,31	0,29±0,11

ность действующих ингредиентов экстракта плаценты.

Представленные значения содержания цианокобаламина (среднее значение – 0,29±0,11 мкг/мл) в образцах препарата коррелируют с результатами ранее проведенного исследования содержания кобальта в препарате «Лаеннек» (0,22–0,27 мкг/кг) (рис. 1).

Как известно, кобальт участвует в образовании структуры цианокобаламина, основу которой составляет так называемое корриновое кольцо, в центре которого располагается ион кобальта (рис. 2).

Молекулярная масса витамина В₁₂ составляет 1355,0 г/моль, а иона кобальта – 58,0 г/моль (то есть всего 4,2% от общей массы молекулы). В составе препарата «Лаеннек» содержание кобальта (0,22–0,27 мкг/кг) и цианокобаламина (0,29±0,11 мкг/мл) соответствует этому процентному соотношению, то есть между ними наблюдается выраженная корреляция (рис. 1).

Биологические эффекты цианокобаламина обусловлены тем, что эта молекула является коферментом. В организме человека известны только два фермента, для функции которых необходим кофермент В₁₂: метилмалонил-КоА-мутаза (ген MUT) и 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин-метилтрансфераза (ген MTR). Метилмалонил-КоА-мутаза катализирует важное звено в цепи реакций биологического окисления белков и жиров – трансформацию метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА, одну из молекул цикла карбоновых кислот (цикла Кребса). Фермент 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин-метилтрансфераза, или метионин синтетаза, катализирует превращение аминокислоты гомоцистеина в аминокислоту метионин (рис. 3). При дефиците В₁₂ активность этого фермента падает, что проявляется в повышении уровня гомоцистеина в плазме крови. Дефициты В₁₂ и фолатов взаимосвязаны: без В₁₂ 5-метилфолат не может быть трансформирован в основную форму фолатов – тетрагидрофолат (если метионин синтетаза не использует 5-метилфолат и гомоцистеин для об-

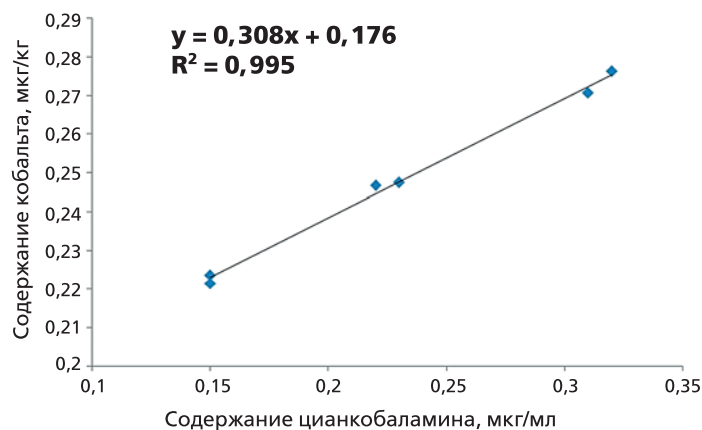


Рис. 1. Корреляция между содержанием кобальта и цианокобаламина в ряде исследованных образцов препарата «Лаеннек»

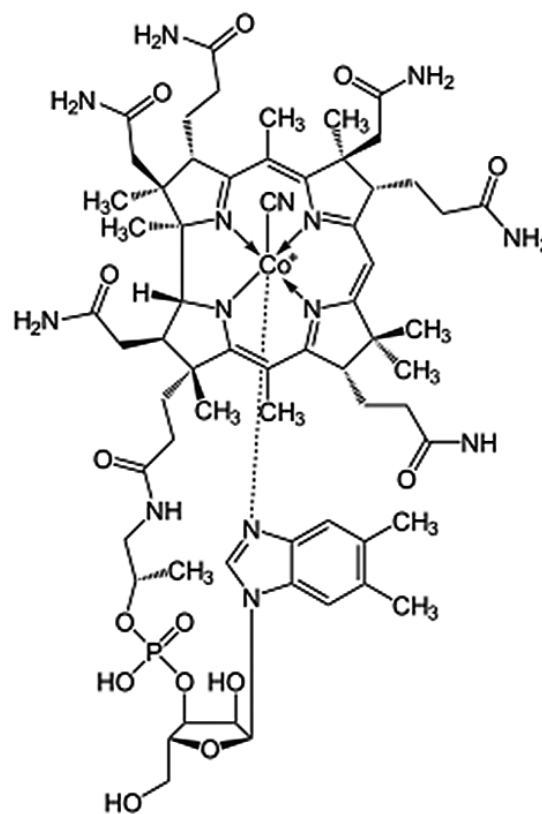


Рис. 2. Химическая структура витамина В₁₂

Таблица 3

Достоверные корреляции между содержанием различных витаминов в составе препарата «Лаеннек»

Витамин 1	Витамин 2	r	P
Цианокобаламин	Витамин К	0,49	0,07
Тиамин	Витамин С	-0,83	0,0016
Тиамин	Витамин Е	0,68	0,015
Тиамин	Витамин В ₆	0,56	0,047
Пантотенат	Витамин С	0,49	0,07
Пантотенат	Ретинол	0,57	0,04
Витамин С	Витамин Е	-0,52	0,05

Примечание:

r — коэффициент корреляции ($|r|=1,0$ для точек, лежащих на одной прямой);

P — достоверность корреляции по распределению Стьюдента

разования метионина и тетрагидрофолата) [7, 17].

Важно заметить, что дотации витамина В₁₂ имеют отчетливый гепатопротекторный эффект: при приеме В₁₂ снижаются уровни печеночных ферментов — аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), отмечается уменьшение количества фиброзных коллагеновых фибрилл, накапливаемых в печени [12].

В исследовании была выявлена корреляция между различными уровнями витаминов в составе препарата «Лаеннек»: между цианокобаламином и витамином К и др. (табл. 3). Отмечены как наиболее выраженные обратная корреляция между

тиамином и витамином С (более высокое содержание тиамин соответствует более низкому содержанию витамина С, и наоборот) и прямая корреляция между тиамином и витамином Е (более высокие уровни тиамин — более высокие уровни витамина Е). Возможно, эти соотношения между уровнями витаминов являются биохимической особенностью препарата «Лаеннек».

Ранее нами был проведен анализ содержания в препарате «Лаеннек» 68 элементов периодической системы Д.И. Менделеева [5]. Исследованные образцы отличались довольно низким содержанием токсичных и условно токсичных микроэлементов, что говорит о качественном питании доноров и благоприятном состоянии окружающей среды. Отмечается высокая стабильность в содержании ионов Na⁺ и Cl⁻ на фоне некоторой диспропорции в соотношении Na:Cl (приблизительно 1:2). Было отмечено повышенное содержание цинка, брома и обсуждавшееся выше довольно высокое (для природных препаратов) содержание кобальта.

Проведенный в настоящей работе анализ соотношений содержания различных элементов в составе «Лаеннека» (табл. 4) показал биологически значимые корреляции, указывающие на подлинность препарата. Так, уровни токсических элементов — ртути, свинца, висмута, технеция — были обратно пропорциональны уровням натрия и прямо пропорциональны уровням ка-

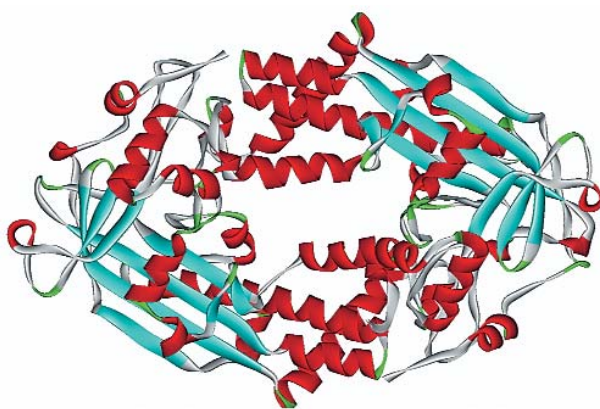


Рис. 3. Пространственная структура метионин синтазы (ленточная модель белка приготовлена с помощью специальной программы PDB для моделирования молекул в 3D формате)

лия, что полностью соответствует имеющимся данным о синергизмах и антагонизмах МЭ [6]. Как известно, своеобразный антагонизм между натрием и калием — это основа жизнедеятельности клетки, непосредственно связанная с синтезом АТФ.

Анализ содержания витаминов и МЭ в составе препарата «Лаеннек» также выявил несколько значимых корреляций (табл. 5). Во-первых, рассмотренная выше корреляция между уровнями кобальта и цианокобаламина, отличающаяся высокой степенью достоверности. Во-вторых, следует отметить корреляцию между активной формой витамина D — 25(OH)D и кальцием: более высокие уровни витамина соответствуют более низким уровням кальция. Действительно, витамин D усиливает всасывание кальция, направляя его в депо костей. В-третьих, выявлены корреляции между содержанием тиамин — одного из основных витаминов, вовлеченных в метаболизм углеводов и жиров, и уровнями калия и кальция, которые также принципиально важны для осуществления энергетического метаболизма. Корреляции между содержанием витамина E, антиоксиданта селена и легко окисляющегося йода соответствуют корреляциям,

обеспечивающим защитную антиоксидантную роль витамина E в организме.

ВЫВОДЫ

Проведение анализа витаминного и микроэлементного составов мультикомпонентного препарата «Лаеннек» на основе гидролизата плаценты важно как для оценки степени очистки и качества производства препарата, так и для понимания основ его гепатопротекторного, иммуномодулирующих и геропротекторного эффектов.

Изучение микроэлементного состава указало на высокую стабильность содержания микроэлементов, крайне низкие уровни содержания всех токсических элементов, что свидетельствует о высокой степени экологической чистоты препарата и большом содержании в его составе иммуномодулирующего элемента — цинка.

Исследование витаминного состава «Лаеннека» выявило высокую стабильность содержания витаминов, что говорит о высокой степени стандартизации технологического процесса.

Препарат содержит значительное количество цианокобаламина, который обладает хорошо известным гепатопротекторным эффектом:

Таблица 4

Некоторые корреляции в элементном составе «Лаеннека»

	Na		K		Co		Zn	
	R	P	r	P	r	P	r	P
Na			-0,84	0,02				
Cl	0,96	0,001	-0,82	0,02				
K	-0,84	0,02			-0,67	0,07		
Ca					-0,83	0,02	-0,82	0,02
Ag	-0,73	0,05						
I	0,72	0,05					0,94	0,002
Hg	0,68	0,07	-0,79	0,03				
Pb	0,86	0,01	-0,91	0,01				
Bi	0,67	0,07	-0,73	0,05				
Th	0,76	0,04	-0,80	0,03				

Примечание:

r — коэффициент корреляции;

P — достоверность корреляции по распределению Стьюдента.

Корреляции между витаминным и микроэлементным составами препарата «Лаеннек»

Витамин	МЭ	r	P
Цианокобаламин	Ca	-0,85	0,015
Цианокобаламин	Mn	-0,68	0,06
Цианокобаламин	Co	1,00	3,3x10 ⁻⁶
25(OH)D	Ca	-0,90	0,007
25(OH)D	Co	0,90	0,007
25(OH)D	Zn	0,80	0,029
Тиамин	K	0,92	0,005
Тиамин	Ca	0,72	0,054
Тиамин	Mn	0,79	0,030
Тиамин	Co	-0,78	0,034
Витамин B ₅	K	-0,65	0,070
Витамин B ₅	Mn	-0,78	0,034
Витамин E	Zn	0,77	0,036
Витамин E	Se	0,66	0,068
Витамин E	I	0,81	0,026

Примечание:

r — коэффициент корреляции;

P — достоверность корреляции по распределению Стьюдента.

2,94±1,06 мкг в разовой дозе (10,0 мл), то есть 98% от рекомендованной в РФ суточной нормы потребления.

Присутствие в составе «Лаеннека» заметных количеств других витаминов (D, K, C, E, B₆ и B₁), а

также наличие соотношений «микроэлемент/микроэлемент» и «микроэлемент/витамин», отвечающих физиологическим нормам, подтверждают тонкость технологического процесса производства препарата. ■

ЛИТЕРАТУРА

1. Микроэлементный состав прогепара / Волков А.Ю., Тогузов Р.Т., Назаренко О.А. и др. //Клинич. фармакология и фармакоэкономика. – 2010. – № 6. – С. 53–57.
2. Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека: результаты клинических и экспериментальных исследований / Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А. и др. //Пластич. хирургия и косметология. – 2011. – № 2. – С. 34–39.
3. Молекулярные механизмы воздействия экстрактов плаценты человека на пигментобразование кожи / Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А. и др. // Вестник эстетич. медицины. – 2012. – Т.11, № 3. – С. 70–77.

4. Пептидный состав препарата плаценты человека «Лаеннек» и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека / Торшин И., Волков А., Гилельс А. и др. // Эстетич. медицина. – 2013. – Т. XII, № 1. – С. 33–45.
5. Препарат «Лаеннек»: элементный состав и фармакологическое действие / Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю. и др. // Пластич. хирургия и косметология. – 2010. – № 4. – С. 1–7.
6. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. – М.: ГэотарМед, – 2008. – 859 с.
7. Banerjee R.V., Matthews R.G. Cobalamin-dependent methionine synthase // FASEB J. – 1990. – V. 4 (5). – P. 1450–1459.
8. Bertelsmann S. Mineralstoffe, spurenelemente und vitamine-klinische aspekte und chemische analyse. – Verlag Bertelsmann Stiftung., Gutersloh, 1997. – P. 72– 78.
9. Cham B.E., Roeser H.P., Kamst T.W. Simultaneous liquid-chromatographic determination of vitamin K1 and vitamin E in serum // Clin. Chem. – 1989. – V. 35. – P. 2285–2289.
10. Gidden F., Shenkin A. Laboratory support of the clinical nutrition service // Clin. Chem. Lab. Med. – 2000 Aug. – V. 38(8). – P. 693–714.
11. Greiling H., Gressner A.M. Lehrbuch der klinischen chemie und pathobiochemie. – Verlag Schattaner, 3. – 1995. – P. 458.
12. Hepatoprotective effect of vitamin B₁₂ on dimethylnitrosamine-induced liver injury / Isoda K., Kagaya N., Akamatsu S., et al. // Biol. Pharm. Bull. – 2008. – V. 31 (2). – P. 309–311.
13. Krapf F.E., Bieger W.P., Tiller F.W. Laboratoren DatenBuch. – Verlag Urban und Schwarzenberg, Munchen, 1995. – P. 361.
14. Lee W., Roberts S.M., Labbe R.F. Ascorbic acid determination with an automated enzymatic procedure // Clin. Chem. – 1997. – V. 43. P. 154–157.
15. Mata-Granados J.M., Luque De Castro M.D. Automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ hydroxyvitamins, and vitamins A and E in human serum by HPLC // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – V. 35. – P. 75–582.
16. Rychlik M. Panthotenic acid quantification by a stable isotope dilution assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Analyst. – 2003. – V. 128. – P. 832–837.
17. Wickramasinghe S.N. Morphology, biology and biochemistry of cobalamin- and folate-deficient bone marrow cells // Clin. Haematol. – 1995. – V. 8 (3). – P. 441–459.