РАЗДЕЛ III. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

Писарев Д.И., Новиков О.О., Алексеева К.А.

**Разработка методики предколоночной дериватизации глутатиона
восстановленного дансилхлоридом для его определения методом обращённо-
фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии**

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет
(Россия, Белгород)*

doi:10.18411/spc-22-02-2018-06

idsp: 000001:spc-22-02-2018-06

Аннотация

Настоящее исследование посвящено разработке методики анализа глутатиона восстановленного с помощью предколоночной дериватизации дансилхлоридом. Дериватизация заключается в непосредственном взаимодействии глутатиона с дансилхлоридом в щелочной среде. Детекцию образовавшихся дериватов проводили по поглощению в УФ-свете с помощью диодно-матричного детектора. Установлено, что при взаимодействии глутатиона с дансилхлоридом образуются два деривата, имеющие разные спектральные данные. Разделение дериватов проводилось в режиме градиентного элюирования. Данную методику также оценивали на возможность количественного определения глутатиона.

Ключевые слова: глутатион восстановленный, дансилхлорид, обращённо-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, дериватизация.

Глутатион (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является важнейшим низкомолекулярным внутриклеточным тиольным трипептидом, синтезируемый практически всеми животными клетками [3]. Его роль заключается в обеспечении ряда важнейших биологических функций. За счёт сульфгидрильной группы цистеина он участвует в реакциях восстановления и конъюгации. С помощью этих реакций удаляются пероксиды и многие ксенобиотические соединения [5]. Удаление ксенобиотических соединений осуществляется путем прямой конъюгации с глутатионом и последующей секрецией продукта из клетки [2]. Таким образом, данная молекула составляет основу интрацеллюлярного окислительно-восстановительного статуса, тем самым, защищая клетки от активных форм кислорода [6].

Описанные биологические эффекты глутатиона подчёркивают его потенциальную терапевтическую активность в коррекции многочисленных нозологий и свидетельствуют о перспективности создания лекарственных препаратов на его основе [4]. Для разработки оптимальных лекарственных форм глутатиона необходимо разработать эффективный способ его анализа.

В научной литературе для анализа глутатиона описан ряд аналитических методов. Нужно отметить, что все современные аналитические подходы определения глутатиона основаны на использовании жидкостной хроматографии с различными детекторами.

В качестве объекта исследования использован глутатион восстановленный (CAS №70-18-8, ЕС № 2007254, Applichem, Германия).

Хроматографическое разделение проводили на приборе «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США) с автоматическим пробоотборником Agilent 1200, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом. Электронные спектры регистрировали с помощью диодно-матричного детектора серии Agilent 1200 (диапазон

длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования - 2 нм.

Для испытаний использовали стальную хроматографическую колонку Ascentisexpress C182,7μм × 100 мм × 4,6 мм.

В качестве подвижной фазы (А) – 1%-ный водный раствор кислоты муравьиной, (Б) – спирт этиловый. Элюирование проводили в следующих условиях:

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Температура колонки: 35 °С

Детекция: 284, 296 нм

Объем вводимой пробы: 1 μл

Элюирование осуществляли в градиентном режиме, приведённом в таблице 1.

Таблица 1

Условия градиентного элюирования дериватов глутатиона

Время, мин	А, %	В, %
0	100	10
60	0	100

Глутатион – молекула, не имеющая значимых хромофорных фрагментов, пригодных для исследования методами УФ-спектроскопии и ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием [1]. Ввиду отсутствия у него собственного поглощения в ультрафиолетовой области спектра нами разработан анализ глутатиона методом ОФ ВЭЖХ посредством его химической модификации.

Анализ заключается в использовании предколоночной дериватизации исследуемой молекулы дансилхлоридом. В результате структура глутатиона, претерпевая химическое превращение, приобретает хромофорную метку, сигнал которой можно зарегистрировать с помощью диодно-матричного детектора в ходе ВЭЖХ-анализа.

Для получения дансильного производного глутатиона предварительно были приготовлены растворы 0,1% дансилхлорида в метаноле и 0,1% глутатиона в 0,05 М растворе буры. В дальнейшем 2 мл приготовленного раствора глутатиона помещали в мерную колбу, вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 0,1%-ного раствора дансилхлорида, взбалтывали. Полученный раствор доводили до метки 0,05 М раствором натрия тетрабората, перемешивали и нагревали в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течение 30 минут. По истечении указанного времени раствор охлаждали до комнатной температуры и хроматографировали в приведённых выше условиях.

В ходе описанного эксперимента, были получены хроматограммы дансилхлорида и дансильных дериватов глутатиона. Реагент дансилхлоридов указанной системе характеризуется наличием одного пика со временем удерживания 6,3 минуты. УФ-спектр дансилхлорида наблюдается при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 284$ нм (рисунок 1).

Рисунок 1. -Хроматограмма и УФ-спектр дансилхлорида

На хроматограмме дериватов глутатиона (рисунок 2) также отмечается пик свободного реагента с аналогичным пиком. При дериватизации глутатиона обнаруживаются два производных со временами удерживания 8,4 мин. и 18,2 мин.

Рисунок 2 –Хроматограмма дансилхлоридных дериватов глутатиона

УФ-спектры получившихся дериватов несколько отличаются друг от друга. Дериват I имел максимум поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 284$ нм, а дериват II, $\lambda_{\text{max}} = 296$ нм. По-видимому, образование двух дериватов обусловлено тем, что глутатион, существует в двух изомерных формах, которые и образуют эти производные.

Для оценки возможности использования данной методики в целях количественного определения глутатиона была определена прямолинейная зависимость между концентрацией дансилированного деривата глутатиона и аналитическим сигналом (площадь пика). Для этого готовили ряд из 6 калибровочных растворов дансилированного глутатиона в диапазоне концентраций 0,001% - 0,04%. Полученные калибровочные растворы хроматографировали в приведённых выше условиях. По результатам хроматографирования был построен градуировочный график зависимости концентрации деривата глутатиона от площади пика (рисунок 4).

Рисунок 4. –Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации деривата глутатиона

Обнаруживаемый минимум для определения деривата глутатиона 0,001% (0,01 мг/мл или $3,2 \times 10^{-5}$ моль).

В указанном диапазоне концентраций градуировочная зависимость была прямолинейной. Уравнение регрессии имело вид:

$$y = 12597x + 16,545$$

Коэффициент корреляции составил 0,9978, что свидетельствует о наличии прямолинейной зависимости значений между площадью пика и содержанием деривата глутатиона.

В ходе проведённых исследований разработана методика определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации дансилхлоридом методом ОФ

ВЭЖХ. При этом образуются два деривата с разными спектральными данными. Разделение дериватов наиболее целесообразно проводить в градиентном режиме элюирования. Также данная методика позволяет оценить количественное содержание исследуемого объекта. Чувствительность определения составила 0,001% или $3,2 \times 10^{-5}$ моль. Прямолинейная зависимость между аналитическим сигналом (площадь пика) и концентрацией наблюдалась в диапазоне 0,001% - 0,04%.

Таким образом, был получен способ анализа, позволяющий оценить нормы качества глутатиона в фармацевтических объектах, в том числе разрабатываемых лекарственных формах на его основе.

1. Чернобровкин, М.Г., Шунина, М.В., Ананьева, И.А., Шаповалова, Е.Н., Шпигун, О.А. (2007). Определение аминокислот в лекарственных препаратах методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. № 4. Том 73. С. 23 – 28.
2. Boyland, E., Chasseaud, L.F. (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 32:173–219.
3. Di Pietra, A.M., Gotti, R., Bonazzi, D., Andrisano, V., Cavrini, V. (1994). HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid. J. Pharm. Biomed. Anal., 12 (1), 91-98.
4. European Pharmacopoeia, 2014. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France: 2727.
5. Yu, B.P., Chung, H.Y. (2006). Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. Mech. Ageing Dev. 127:436–443. 19
6. Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., Linseman, D.A. (2007). Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria. The Journal of biological chemistry. 282 (40): 29296–29304. 20