РАЗДЕЛ XVI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

Писарев Д.И., Алексеева К.А.

Использование ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией для определения глутатиона в образцах природного происхождения

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

doi: 10.18411/sr-10-02-2019-63

idsp: sciencerussia-10-02-2019-63

Аннотация

Настоящее исследование посвящено разработке методики анализа глутатиона восстановленного с помощью предколоночной дериватизации в растительных объектах. Для определения глутатиона в природных источниках использовались реакции дериватизации с дансилхлоридом, о-фталевым альдегидом и 1-бром-2,4-динитробензолом. В качестве тест-объектов, содержащих глутатион были выбраны пивные дрожжи, цветочная пыльца и сок киви. Детекцию образовавшихся дериватов проводили по поглощению в УФ-свете с помощью диодно-матричного детектора. Установлено, что дериваты глутатиона присутствуют на всех хроматограммах, что является доказательством того, что использованные реакции дериватизации являются избирательными и чувствительными для глутатиона даже в присутствии сопутствующих компонентов, содержащихся в выбранных объектах.

Ключевые слова: глутатион восстановленный, дансилхлорид, 1-бром-2,4-динитробензол, орто-фталевый альдегид, обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, дериватизация.

Важную роль в антиоксидантной защите организма человека играют легкоокисляющиеся биологически активные серосодержащие соединения, одним из которых является глутатион. Ведущая роль в антиоксидантном действии глутатиона заключается в защите клеток организма от действия активных кислородных форм, в большей степени от ОН-радикала.

Кроме того, глутатион эффективно взаимодействует с ионами металлов переменной валентности, защищая клетки от токсичного действия ионов тяжелых металлов (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}). Защитные и регуляторные эффекты эндогенного глутатиона могут быть усилены экзогенным глутатионом.

Глутатион содержится в многих объектах природного происхождения. В качестве исследуемых объектов были выбраны пивные дрожжи, цветочная пыльца и сок киви, состав которых включает комплекс аминокислот и пептидов, в том числе глутатион.

Наиболее подходящими для определения глутатиона в природных источниках оказались реакции дериватизации с дансилхлоридом, о-фталевым альдегидом и 1-бром-2,4-динитробензолом.

Для экстракции глутатиона из дрожжевого материала был использован ряд экстрагентов: вода, а также водные растворы с добавлением кислотных или щелочных модификаторов, в качестве которых применяли 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной и 0,05 М раствор натрия тетрабората. Результаты показали, что наилучший выход глутатиона наблюдался при экстракции 0,05 М раствором натрия тетрабората.

Хроматографическое разделение проводили на приборе «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США). 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 Ascentis express C18 2,7 μm $\times$ 100 мм $\times$ 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 $\mu\text{л}$

Элюирование осуществляли в градиентном режиме, приведённом в таблице 1.

Таблица 1.

Условия градиентного элюирования дериватов глутатиона

Время, мин	А, %	В, %
0	100	10
45	0	100

Хроматограмма разделения дансилхлоридных дериватов аминокислот и пептидов пивных дрожжей представлена на рисунке 1.

Рисунок 1 – Хроматограмма дансилхлоридных дериватов аминокислот и пептидов дрожжей (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

На представленном рисунке отмечается доминирующий пик, который по времени удерживания – 8,874 мин и УФ-спектру соответствует стандартному образцу деривата глутатиона с дансилхлоридным (DNC) реагентом. Таким образом, можно утверждать, что с помощью приложенной методики можно обнаружить глутатион в составе дрожжевого материала.

Так как, в указанных условиях пик дансилхлоридного деривата глутатиона разделяется по базовой линии (коэффициент разделения R_s – 2,84) с прочими DNC-дериватами аминокислот и пептидов дрожжей, то настоящую методику можно применять для оценки количественного содержания искомого пептида в пивных дрожжах.

При дериватизации боратного извлечения из пивных дрожжей о-фталевым альдегидом (OPHA), также удалось обнаружить OPHA-дериват глутатиона. Хроматограмма OPHA-дериватов аминокислот и пептидов пивных дрожжей, представлена на рисунке 2.

Рисунок 2 – Хроматограмма ОРНА-derivатов аминокислот и пептидов дрожжей (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

На рисунке обнаруживается пик со временем удерживания 18,782 мин, который по времени удерживания и УФ-профилю пропорционален таковому стандартному образцу ОРНА-derivата глутатиона.

Как показывают приведённые параметры пригодности, коэффициент разделения составил R_s – 1,53, что свидетельствует об удовлетворительной разделяющей способности использованной хроматографической системы.

При использовании в качестве дериватизирующего агента 1-бром-2,4-динитробензола (DNBB) в боратном извлечении из дрожжевой массы, также удалось обнаружить DNBB-derivат глутатиона. Результаты хроматографирования DNBB-derivатов аминокислот и пептидов дрожжей представлены на рисунке 3.

Рисунок 3 – Хроматограмма DNBB-derivатов аминокислот и пептидов дрожжей (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

На приведённой хроматограмме, обнаруживается пик со временем удерживания 15,111 мин, который по времени удерживания и УФ-профилю соответствует СО DNBB-derivата глутатиона.

Как следует из приведённых в таблице данных, коэффициент разделения DNBB-derivата глутатиона составил R_s - 16,07, что свидетельствует о хорошей разделяющей способности хроматографической системы. Это можно использовать для количественного определения глутатиона в дрожжевом материале с помощью данной реакции.

При дериватизации боратных извлечений из цветочной пыльцы и сока киви о-фталевым альдегидом не удалось обнаружить ОРНА-derivаты глутатиона. На хроматограммах дериватизации цветочной пыльцы дансилхлоридом и 1-бром-2,4-динитробензолом (рисунок 4,5) обнаруживаются пики DNC-derivатов и DNBB-derivатов глутатиона

Дериватизацию сока киви удалось провести только с помощью дериватизации дансилхлоридом (рисунок 6).

Рисунок 4 – Хроматограмма DNC-derivатов аминокислот и пептидов цветочной пыльцы (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

Рисунок 5 – Хроматограмма DNBB-derivатов аминокислот и пептидов цветочной пыльцы (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

Рисунок 6 – Хроматограмма DNC-derivатов аминокислот и пептидов сока киви (экстрагент - 0,05 М раствор тетрабората натрия)

Представленные хроматограммы показывают, что дансильный дериват глутатиона присутствует на всех хроматограммах, что является доказательством того, что реакция дансилирования является избирательной и чувствительной для глутатиона даже в присутствии сопутствующих компонентов, содержащихся в выбранных объектах. Поэтому настоящая методика с использованием дансилхлорида как дериватизатора может быть признана пригодной для определения глутатиона в объектах природного происхождения.

1. Определение аминокислот в лекарственном растительном сырье методом ТСХ: на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной [Текст] / О. В. Тринеева Е. Ф. Сафонова, А. В. Синкевич [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 5. – С. 37-41.
2. Определение аминокислот в тканях и органах свиней методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / Н. Н. Дудкина, Е. Н. Беспмятных, А. В. Лысов [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – № 3. – С. 171-173.
3. Camera, E. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes [Text] / E. Camera, M. Picardo // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2002. – Vol. 781, № 1-2. – P. 181-206.
4. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples [Text] / Y. Iwasaki, Y. Saito, Y. Nakano [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2009. – Vol. 877, № 28. – P. 3309-3317.
5. HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetyl-cysteine ethyl ester: evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG [Text] / J. T. Michaelsen, S. Dehnert, D. Giustarini [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2009. – Vol. 877, № 28. – P. 3405-3417.