

УДК 543.544:577.112.3



РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО

Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютина А.Ю., Бойко Н.Н.

ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России,
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Глутатион (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является важнейшим низкомолекулярным внутриклеточным тиольным трипептидом, состоящим из трёх аминокислот – глицина, цистеина и кислоты глутаминовой. Поскольку в отечественной фармакопее отсутствует нормативная документация на глутатион, разработка фармакопейной статьи на указанную субстанцию является актуальной проблемой. **Цель.** Разработка методик определения посторонних специфических примесей в глутатионе. **Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использованы субстанция – глутатион восстановленный (CAS №70-18-8, ЕС №2007254, Applichem, Германия), содержащий примеси и стандартный образец глутатиона восстановленного – Sigma Aldrich (Япония). Анализ проводился с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращённо-фазном варианте и тонкослойной хроматографии. Хроматографирование с помощью ОФ ВЭЖХ проводили после предварительной дериватизации глутатиона и его специфических примесей дансилхлоридом. Поскольку специфические примеси в глутатионе представляют собой дипептиды и аминокислоты, следовательно, они также как и сам глутатион способны вступать в реакцию с дансилхлоридом с образованием дансильных производных, которые далее можно определить в ходе хроматографического разделения. **Результаты.** В результате хроматографирования методом ОФ ВЭЖХ дериватизированного дансилхлоридом глутатиона установлено, что данная реакция позволяет обнаружить примеси в нём. Дериваты глутатиона хорошо разделяются при хроматографировании методом ОФ ВЭЖХ и имеют отличающиеся максимумы поглощения. Дериват глутатиона имел максимум поглощения при $\lambda_{max} = 284$ нм. Дериваты, принадлежащие специфическим примесям глутатиона, поглощают при $\lambda_{max} = 288$ нм и $\lambda_{max} = 296$ нм. Данные полученные с помощью ОФ ВЭЖХ были подтверждены методом TCX в системе изо-пропанол – вода 2:1. Обнаружено три компонента, один из которых соответствует глутатиону, два остальных – примеси. **Заключение.** Разработаны методики определения примесей в субстанции глутатиона с помощью методов ОФ ВЭЖХ с предварительной дериватизацией дансилхлоридом и TCX с детекцией нингидрином. Сравнительный анализ полученных данных позволяют утверждать, что метод ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией является более достоверным, поскольку более чувствителен к примесям, к тому же даёт возможность изучить УФ-профили примесных компонентов, чем метод TCX. Поэтому для обнаружения примесей в субстанции глутатиона более предпочтительно использовать ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией. Результаты настоящего исследования можно рекомендовать для включения в нормативную документацию на субстанцию глутатиона в раздел «Примеси».

Ключевые слова: глутатион, примеси, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография

Для цитирования:

Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютина А.Ю.,
Бойко Н.Н.
РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО
Фармация и фармакология. 2018;6(6):535-547
DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-6-535-547
© Алексеева К.А., Писарев Д.И., Малютина А.Ю.,
Бойко Н.Н., 2018

For citation:

Alexeeva K.A., Pisarev D.I., Malyutina A.Yu.,
Boyko N.N.
DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF SPECIFIC IMPURITIES IN THE GLUTATIONION RESTORED SUBSTANCE
Pharmacy & Pharmacology. 2018; 6(6):535-547. Russian.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-535-547

DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF SPECIFIC IMPURITIES IN THE GLUTATIONION RESTORED SUBSTANCE

Alexeeva K.A., Pisarev D.I., Malyutina A.Yu., Boyko N.N.

Belgorod State Research University, 85, Pobeda St., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is the most important low molecular weight intracellular thiol tripeptide consisting of three amino acids – glycine, cysteine and glutamic acid. In Russian pharmacopoeia there is no regulatory documentation for glutathione, therefore, the development of a pharmacopoeial item for the specified substance is a relevant problem. The aim of the article is the development of methods for determining foreign specific impurities in glutathione. Materials and methods. The substance of glutathione reduced (CAS 70-18-8, EC 2007254, Applichem, Germany) containing impurities, and a standard sample of reduced glutathione (Sigma Aldrich, Japan) were used as the objects of the study. The analysis was carried out by using a high-performance liquid chromatography method in the reverse phase version and a thin layer chromatography method. The chromatography using RP HPLC was performed after preliminary derivatization of glutathione and its specific impurities with dancil chloride. Specific impurities in glutathione are dipeptides and amino acids. Therefore, they, like glutathione, can react with dancil chloride. Dancil derivatives are formed, and they can be determined by chromatographic separation. Results. As a result of chromatography by the method of RP HPLC of derivatized dancil chloride glutathione it has been established that this reaction makes it possible to detect impurities in it. Glutathione derivatives are well separated by chromatography by implementing the method of RP HPLC and have different absorption maxima. The glutathione derivative had an absorption maximum at $\lambda_{max}=284$ nm. The derivatives belonging to specific glutathione impurities absorb at $\lambda_{max}=288$ nm and $\lambda_{max}=296$ nm. The data obtained using RP HPLC were confirmed by TLC in the isopropanol-water (2:1) system. Three components were found out, one of which corresponds to glutathione, while two others are impurities. Conclusion. Methods for determining impurities in the glutathione substance using RP HPLC methods with preliminary derivatization with dancil chloride and TLC with ninhydrin detection have been worked out. A comparative analysis of the data obtained makes it possible to state that the OF-HPLC method with pre-column derivatization is more reliable, since it is more sensitive to impurities, and also makes it possible to study the UV profiles of impurity components better than the TLC method. Therefore, for the detection of impurities in the substance of glutathione, it is more preferable to use RP-HPLC with pre-column derivatization. The results of this study can be recommended for inclusion in the regulatory documentation on the substance of glutathione in the section "Impurities".

Keywords: glutathione; impurities; high performance liquid chromatography; thin layer chromatography

ВВЕДЕНИЕ. Чистота является важнейшим показателем доброкачественности фармацевтических субстанций. Определение чистоты любой фармацевтической субстанции сводится к установлению примесей. Примеси могут представлять собой остатки промежуточных продуктов синтеза, либо накапливаться в процессе хранения, как результат воздействия различных физических (тепло, свет, кислород воздуха, влага) или химических (тяжёлые металлы, pH) факторов на основной действующий компонент. Кроме того, примеси могут иметь техногенный характер, то есть приобретаться в процессе производства действующего вещества, к таким примесям чаще всего относятся остаточные растворители. Примеси могут быть токсичными, то есть способными оказывать негативное влияние на организм, либо иметь иной характер фармакологической активности, нередко противоположной исходному веществу. Примеси также могут быть индифферентными в фармакологическом плане. Последние, накапливаясь в основном веществе, снижают содержание биологически активных веществ и соответственно, уменьшают их активность. Вследствие этого определение чистоты субстанций, которые используются для изго-

тования лекарственных препаратов, имеет большое значение. Поэтому в фармакопейной статье (ФС) или фармакопейной статье предприятия ФСП на любую фармацевтическую субстанцию обязательно отмечаются возможные примеси, допустимые пределы их содержания, и приводятся испытания, подтверждающие отсутствие примесных компонентов.

Настоящее исследование посвящено разработке методик определения примесей в субстанции глутатиона.

Глутатион (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является важнейшим низкомолекулярным внутриклеточным тиольным трипептидом, состоящим из трёх аминокислот – глицина, цистеина и кислоты глутаминовой. Биологическая функция глутатиона охватывает как поддержание окислительно-восстановительного статуса клетки, так и обезвреживание ксенобиотических молекул. Он также является основным окислительно-восстановительным агентом большинства аэробных организмов, играет важнейшую роль в глутатионзависимом катализе – процессе метаболической адаптации, характерной для всех форм жизни. В ходе эволюции живые системы начали использовать его в качестве универсального нуклеофила для химического превращения множества

электрофильных веществ. Происходит это благодаря тому, что глутатион входит в состав множества так называемых глутатион-зависимых ферментов, среди которых глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, пероксидредуктаза, глиоксалазы 1 и 2, глутатионтрансфераза, ускоряющих большинство химических реакций в многочисленных путях метаболизма. [1–4].

За счёт сульфгидрильной группы цистеина он участвует в реакциях восстановления и конъюгации, с помощью которых удаляются пероксиды и многие ксенобиотические соединения [5]. Реакции элиминации пероксидов происходят благодаря тому, что глутатион выполняет роль кофактора у фермента глутатионпероксидазы, при этом предотвращается окисление свободных тиольных групп важнейших белков, в том числе ферментов, снижается перекисное окисление фосфолипидов мембран клеток [6]. Удаление ксенобиотических соединений осуществляется путем прямой конъюгации с глутатионом и последующей секрецией аддукта из клетки [7]. Таким образом, данная молекула составляет основу интрацеллюлярного окислительно-восстановительного статуса, тем самым, защищая клетки от активных форм кислорода [8].

Для анализа глутатиона используется ряд физико-химических методов. Спектрофотометрия, основанная на взаимодействии глутатиона 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты [9] и с реагентом Эллмана [10]. Спектрофлуориметрический метод основан на взаимодействии о-фталевого альдегида с SH-группой глутатиона, с образованием флуоресцентного конъюгата [11, 12]. Методом жидкостной хроматографии с различными детекторами [13], а также с предколоночной дериватизацией. В качестве дериватизаторов используют этакриновую кислоту и ее метиловый эфир [14], N-этилмалеимид [15].

Для идентификации глутатиона, связанного с белками в органах и клетках, используется жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией и tandemной масс-спектрометрией [16, 17], в том числе этот метод используется для определения глутатиона в мозге крыс линии Wistar [18]. Для совместного определения глутатиона и его прекурсоров – цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина в слюне используется реакция восстановления дисульфидов в тиолы, дериватизации производных 2-S-хинолином с 2-хлор-1-метилхинолинийтетрафторборатом и количественном определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [19]. В литературе [20, 21] представлено вольтамперометрическое определение глутатиона.

Глутатион описан во многих фармакопеях, в том числе Европейской, Британской, Японской и т.д. [22–24]. В отечественной фармакопее отсутствует нормативная документация на глутатион, следовательно, разработка ФС на указанную субстанцию является актуальной проблемой. Настоящий материал может быть использован для включения в разрабатываемую фармакопейную статью на глутатион, а именно в раздел «Примеси».

ЦЕЛЬ. Разработка методик определения посторонних специфических примесей в глутатионе.

Для реализации поставленной цели применялись два аналитических подхода для определения примесей. Первый аналитический подход заключался в использовании классической тонкослойной хроматографии, второй – в применении ОФ ВЭЖХ после предварительной дериватизации глутатиона и соответствующих примесей дансилхлоридом в данильные производные. Ранее нами предпринимались попытки определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации с 4-метокси-2-нитрофенилроданидом [25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объекта исследования использована субстанция глутатиона восстановленного (CAS №70-18-8, EC №2007254, Applichem, Германия), содержащего примеси и стандартный образец глутатиона восстановленного – Sigma Aldrich (Япония).

Европейская и Британская фармакопеи (ЕФ, БФ) предусматривают наличие 5 примесей в глутатионе [22, 23], структуры четырёх из которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Структурные формулы примесей в глутатионе согласно ЕФ и БФ

L-Цистеинилглицин	L-Цистеин	Глутатион окисленный	L-глутамилцистеин

Пятая примесь с неизвестной структурой является продуктом деградации глутатиона. Идентификацию примесей согласно ЕФ и БФ проводится с использованием метода капиллярного электрофореза.

Японская фармакопея предлагает для определения примесей метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором при длине волны $\lambda = 210$ нм [24].

Использование ОФ ВЭЖХ для определения примесей в глутатионе.

Настоящий хроматографический метод является универсальным, поскольку с его помощью одновременно определяется большое число параметров, характеризующих разделение, идентификацию, количественную оценку компонентов [26].

Хроматографическое разделение методом ОФ ВЭЖХ проводили на приборе «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США). Электронные спектры регистрировали с помощью диодно-матричного детектора серии Agilent 1200. Разделение проводили на

стальной колонке Ascentis express C₁₈ 2,7 μм × 100 мм × 4,6 мм.

Состав мобильной фазы включал (A) – 1%-ный водный раствор кислоты муравьиной, (Б) – спирт этиловый. Элюирование осуществляли в следующих условиях:

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Температура колонки: 35°C

Детекция: 284, 288, 296 нм

Объем вводимой пробы: 1 мкл

Элюирование осуществляли в градиентном режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Условия градиентного элюирования дериватов глутатиона

Время, мин	A, %	B, %
0	100	10
60	0	100

Методика дериватизации глутатиона и примесей. 2 мл 0,1%-ного раствора глутатиона в 0,05 н. водном растворе тетрабората натрия помещали в склянку для анализа, добавляли 2 мл 0,1%-ного спиртового раствора дансилахлорида, взбалтывали. Полученный раствор доводили до метки 0,05 н. раствором натрия тетрабората, перемешивали и хроматографировали в приведённых выше условиях.

Использование хроматографии в тонком слое сорбента для определения примесей в глутатионе.

Тонкослойная хроматография – доступный и дешевый метод качественного и полуколичественного анализа органических соединений. Его отличают высокая чувствительность, экспрессность, доступность и простота выполнения, возможность использования агрессивных реагентов для проявления веществ [27].

Определение примесей в тонком слое сорбента проводили на пластинах марки TLC Silica gel 60 F 254, TLC Silica gel 60 фирмы Merck, на алюминиевой подложке с толщиной слоя сорбента 200 мкм, с нанесенным рабочим слоем фракционированного сорбента толщиной 200 мкм. Хроматографирование проводили восходящим способом в стандартных условиях.

Анализируемый объект в концентрации 0,5%

растворяли в воде и наносили микрошипцием в количестве 2 мкл на линию старта. В качестве подвижной фазы использована бинарная система изо-пропанол – вода в соотношении 2:1.

Для детектирования зон адсорбции глутатиона и примесей на хроматограмме использовали дериватизацию с помощью обработки хроматограмм 0,5%-ным спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100°C в течении 5 минут, при этом зоны адсорбции глутатиона и примесей проявлялись в виде красно-фиолетовых пятен.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Поскольку специфические примеси в глутатионе представляют собой дипептиды и аминокислоты, следовательно, они также, как и сам глутатион способны вступать в реакцию с дансилахлоридом с образованием дансильных производных, которые далее можно определить в ходе хроматографического разделения методом ОФ ВЭЖХ.

В результате хроматографирования методом ОФ ВЭЖХ дериватизированного дансилахлоридом глутатиона установлено, что данная реакция позволяет обнаружить примеси в глутатионе (рис. 1).

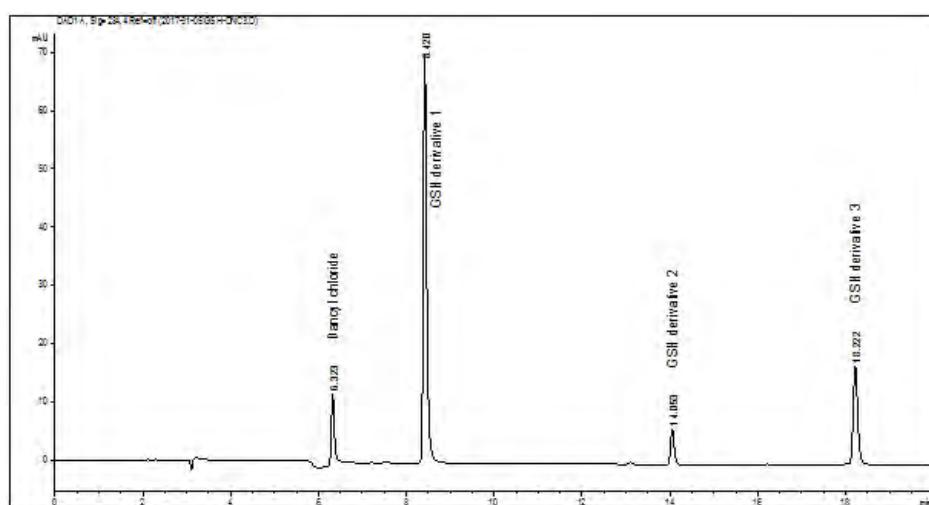


Рисунок 1 – Хроматограмма дансилахлоридных дериватов глутатиона

На представленной хроматограмме обнаруживаются три деривата со временами удерживания 8,4 мин, 14,053 и 18,2 мин., причём компонент со временем удер-

живания 8,4 мин принадлежит чистому глутатиону, что подтверждается хроматографированием стандартного образца (СО) глутатиона, лишённого примесей (рис. 2).

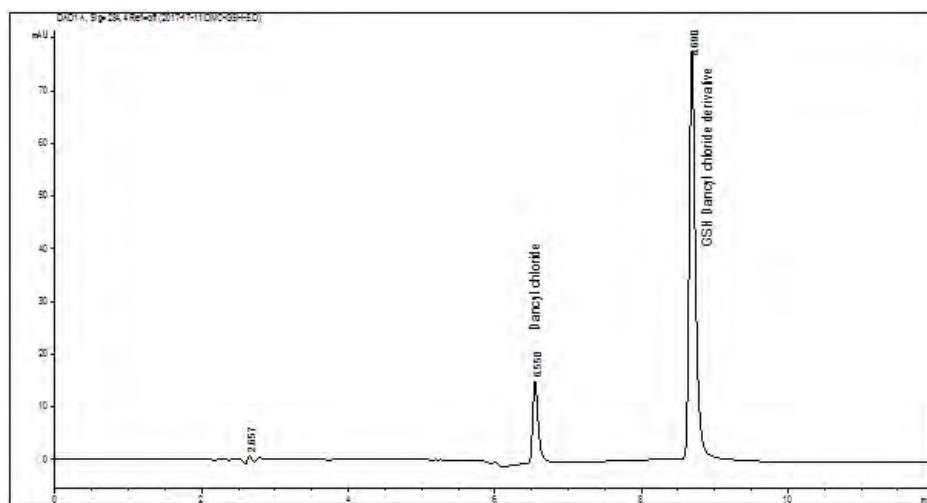


Рисунок 2 – Хроматограмма СО глутатиона (без примесей)

Остальные компоненты представляют собой примеси в анализируемом образце глутатиона.

УФ-спектры всех дериватов представлены на рисунке 3.

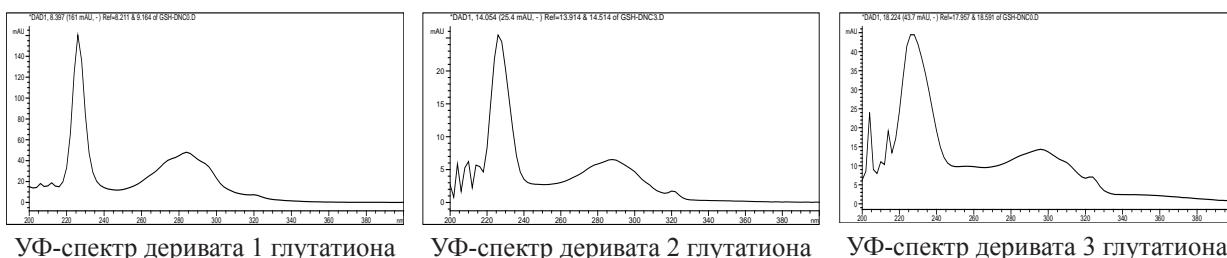


Рисунок 3 – УФ-спектры дериватов глутатиона

Представленные на рисунке 3 УФ-спектры получившихся дериватов несколько отличаются друг от друга. Дериват глутатиона 1 имел максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 284$ нм. Дериваты, принадлежащие специфическим примесям глутатиона поглощают при $\lambda_{\max} = 288$ нм (дериват 2) и $\lambda_{\max} = 296$ нм (дери-

ват 3). Дериват со временем удерживания 14,053 был идентифицирован как цистеин, а компонент, имевший время удерживания 18,222 – глутатион окисленный.

Рассчитанные параметры пригодности хроматографической системы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Параметры пригодности хроматографической системы для определения примесей в глутатионе с помощью дериватизации дансильхлоридом

t_R	Area	N	R_s	T_f	W_b
8,42	386,60	62598	16,39	0,68	0,0792
14,053	36,40	150256	40,22	0,73	0,2667
18,222	121,05	156705	25,30	0,81	0,1083

Примечание: t_R – абсолютное время удерживания, N – число теоретических тарелок, R_s – коэффициент разделения пиков, T_f – коэффициент асимметрии, W_b – ширина пика на базовой линии

По полученным данным составлены условия проверки для проверки пригодности хроматографической системы.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы

0,025 г цистеина и 0,025 г субстанции глутатиона восстановленного помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, растворяли в 10 мл 0,05 М

раствора натрия тетрабората, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора сравнения выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику дансильного деривати-

- вата глутатиона должна быть не менее 56000 теоретических тарелок;
- коэффициент разделения пиков дансильного деривата глутатиона и цистеина должен быть не менее 15;
 - относительное стандартное отклонение площади пика DNC-производного глутатиона должно быть не более 2,0%;
 - коэффициент симметрии пика DNC-производного глутатиона на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения глутатиона должен быть от 0,6 до 1,0.

Предел обнаружения глутатиона для данной методики с требуемой правильностью и прецизионностью – 0,001%. На хроматограмме, полученной при количественном определении содержание глутатиона окисленного должно быть не более 1,5%. Содержание других примесей должно быть не более 0,5%. Суммарное содержание примесей должно быть не более 2,5%.

Данные, полученные с помощью ОФ ВЭЖХ, были подтверждены в ходе хроматографирования методом ТСХ. На рисунке 4 представлена хроматограмма глутатиона, содержащего примеси.



Рисунок 4 – ТСХ хроматограмма глутатиона с примесями

На рисунке показаны 3 зоны адсорбции, две из которых принадлежат примесям.

Компонент с коэффициентом подвижности R_f – 0,35, имеющий красно-фиолетовую окраску, принадлежит глутатиону. Компоненты со значениями R_f – 0,45 (бледно-красного цвета) и 0,3 (коричневого цвета) принадлежат примесям.

В ходе изученного информационного массива по аналитическим подходам для определения примесей в субстанции глутатиона, предлагаемым зарубежными фармакопеями, в том числе такими авторитетными как Европейская и Британская установлено, что данные источники регламентируют тестировать чистоту глутатиона метод капиллярного электрофореза. Указанный метод хоть и является эффективным, однако не так часто задействован в рутинной аналитической работе, поэтому его использование для определения примесей в глутатионе может вызвать затруднения. В Японской фармакопее предусмотрено определение примесей в глутатионе методом ВЭЖХ с УФ-детекцией при длине волны 210 нм. Чувствительность и надёжность такого подхода вызывает сомнения, поскольку все примеси, которые определяются в глутатионе являются алифатическими аминокислотами и пептидами, которые очень слабо поглощают в УФ-области спектра. Также регламентируемая длина волны (210 нм) – не является специфичной для данных соединений, так как в этой области спектра поглощает большинство известных органических соединений, в том числе растворители.

Приоритетным инструментом в отечественных аналитических лабораториях, как наиболее полно отвечающим требованиям фармацевтического анализа, до сих пор остаётся метод ОФ ВЭЖХ. Поэтому практически вся методическая база для большин-

ства лекарственных веществ адаптирована именно под данный метод. Вместе с тем, актуальным методом для определения примесей остаётся метод тонкослойной хроматографии. Поэтому предложенный нами подход, а именно сочетание предколоночной дериватизации дансилюхоридом с последующим определением методом ОФ ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии для определения примесей в глутатионе, легко реализуем практически в любой лаборатории. Его отличают отсутствие сложной пробоподготовки, чувствительность, экспрессность. Кроме того, предколоночная дериватизация дансилюхоридом с последующим хроматографическим определением ОФ ВЭЖХ может быть использована также для подлинности и количественного определения глутатиона. Следовательно, можно утверждать, что данный аналитический подход является универсальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведённых исследований разработаны методики определения примесей в субстанции глутатиона с помощью методов ОФ ВЭЖХ с предварительной дериватизацией дансилюхоридом и ТСХ с детекцией нингидрином. Сравнительный анализ полученных результатов позволяют утверждать, что метод ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией является достоверным, поскольку более чувствителен к примесям, к тому же показывает возможность изучить УФ-профили примесных компонентов, чем метод ТСХ. Поэтому для обнаружения примесей в субстанции глутатиона более предпочтительно использовать ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией. Результаты настоящего исследования можно рекомендовать для включения в нормативную документацию на субстанцию глутатиона в раздел «Примеси».

INTRODUCTION. Purity is the most important indicator of a good quality of pharmaceutical substances. The purity determination of any pharmaceutical substance is reduced to the determination of impurities. Impurities can be residues of intermediate products of synthesis or can be accumulated during the storage as a result of impact of various physical (heat, light, oxygen, moisture) or chemical

(heavy metals, pH) factors on the main active component. In addition, impurities can have a man-made character, i. e., be acquired during an active ingredient production process; such impurities most often include residual solvents. Impurities can be toxic, i. e. able to have a negative impact on the body or to have a different nature of pharmacological activity which is often opposite to the original substance. Impu-

rities can also be indifferent within pharmacological terms. The latter, being accumulated in the main substance, reduce the content of biologically active substances and therefore reduce their activity. As a consequence, the determination of purity of the substances used for the manufacture of medicines is of great importance. Therefore, in a pharmacopoeial item or in a manufacturer's monograph for any pharmaceutical substance possible impurities, permissible limits of their content are necessarily noted and the tests confirming the absence of impurity components are given.

This study is devoted to the development of methods for determining impurities in the substance of glutathione.

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is the most important low molecular intracellular thiol tripeptide consisting of three amino acids – glycine, cysteine and glutamic acid. The biological function of glutathione encompasses both the maintenance of the redox status of a cell and the neutralization of xenobiotic molecules. Glutathione is the main redox agent of most aerobic organisms. It plays the main role in glutathione-dependent catalysis, a process of metabolic adaptation characteristic for all life forms. Within the course of evolution, all living systems began to use it as a universal nucleophile for the chemical transformation of many electrophilic substances. This is due to the fact that glutathione is a part of many so-called glutathione-dependent enzymes including glutathione reductase, glutathione peroxidase, peroxide reductase, glyoxalase 1 and 2, glutathione transferase, which accelerate most of these chemical reactions in multiple metabolic pathways [1–4].

Due to the cysteine sulphydryl group it participates in reduction and conjugation reactions. Peroxides and many xenobiotic compounds are removed with the help of these reactions [5]. Peroxide elimination reactions occur due to the fact that glutathione plays the role of cofactor within the glutathione peroxidase enzyme, along with it preventing the oxidation of free thiol groups of the most important proteins, including enzymes, and the peroxidation of cell membrane phospholipids is also reduced [6]. The removal of xenobiotic compounds is carried out by direct conjugation with glutathione and subsequent secretion of the adduct from the cell [7]. Thus, this molecule forms the basis of the intracellular redox status thereby protecting cells from active oxygen forms [8].

A number of physicochemical methods are used for glutathione. First of all, it is spectrophotometry based on the interaction of glutathione with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic

acid [9] and with Ellman's reagent [10]. The spectrofluorimetric method is based on the interaction of o-phthalic aldehyde with the glutathione SH-group forming fluorescent conjugate [11, 12]. It is also a liquid chromatography method with various detectors [13], as well as with pre-column derivatization. Ethacrynic acid and its methyl ester [14], N-ethylmaleimide [15] are used as derivatizers. To identify glutathione bound to proteins in organs and cells, liquid chromatography in combination with mass spectrometry and tandem mass spectrometry is used [16, 17]. This method is also used to determine glutathione in the brains of Wistar rats [18]. For the joint determination of glutathione and its precursors (cysteine, cysteinylglycine and homocysteine) in saliva, the reduction reaction of disulfides to thiols, derivatization of 2-S-quinoline derivatives with 2-chloro-1-methylquinoline tetrafluoroborate and quantification using high performance liquid chromatography is used [19]. Voltamperometric glutathione determination is also described [20, 21].

Glutathione is a part of many pharmacopoeias including European, British, Japanese, etc. [22–24]. In Russian pharmacopoeia there is no regulatory documentation for glutathione, therefore the development of the pharmacopoeial item for the specified substance is an actual problem. This material can be used for inclusion into the pharmacopoeial item on glutathione, namely in the section "Impurities".

THE AIM of the article is the development of methods for the determination of specific impurities in glutathione. To achieve this goal, two analytical approaches for the impurities determination were developed. The first analytical approach implies classical thin-layer chromatography; the second implies the use of RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) after preliminary derivatization of glutathione and the corresponding impurities by dancil chloride into dancil derivatives. Earlier an attempt was made to determine glutathione by using precolumn derivatization with 4-methoxy-2-nitrophenyl-rhodide [25].

MATERIALS AND METHODS. As the object of the study, the reduced substance of glutathione (CAS 70-18-8, EC 2007254, Applichem, Germany) containing impurities and the standard reduced glutathione sample (Sigma Aldrich (Japan)) was used.

European (Ph. Eur.) and British (B.P.) Pharmacopoeias allow the presence of 5 impurities in glutathione [22, 23], the structures of four of which are enlisted in Table 1.

Table 1 – Structural formulas of impurities in glutathione according to Ph. Eur. and B.P.

L-Cysteinylglycine	L-Cysteine	Glutathione oxidized	L-glutamylcysteine

The fifth impurity with an unknown structure is the product of glutathione degradation.

The identification of impurities according to the European and British Pharmacopoeias is carried out by method of capillary electrophoresis.

For the impurities determination, Japanese Pharmacopoeia offers a method of high-performance liquid chromatography (HPLC) with an ultraviolet detector at the wavelength of $\lambda = 210$ nm [24].

Use of RP-HPLC to determine impurities in glutathione

This chromatographic method is universal due to the fact that it simultaneously determines a large number of parameters characterizing separation, identification and quantitative evaluation of the components [26].

Table 2 – Conditions for glutathione derivatives gradient elution

Time, min	A, %	B, %
0	100	10
60	0	100

Derivatization methods of glutathione and impurities

2 ml of 0.1% glutathiol solution in 0.05 n. sodium tetraborate aqueous solution was placed in a flask for analysis, 2 ml of 0.1% spirit dancil chloride solution was added and agitated. The resulting solution was brought to the mark of 0.05 n. by sodium tetraborate solution, stirred and chromatographed under the above mentioned conditions.

Use of chromatography in a thin layer of sorbent for the determination of impurities in glutathione

Thin layer chromatography is an affordable and cheap method of qualitative and semi-quantitative analysis of organic compounds. It is distinguished by high sensitivity, rapidity, accessibility and implementation simplicity, the possibility of using aggressive reagents for the substances manifestation [27].

Determination of impurities in a thin layer of sorbent was carried out on TLC Silica gel 60 F 254, TLC Silica gel 60 plates from Merck, on an aluminum substrate with a sorbent layer thickness of 200 μm with a 200 μm thick applied sorbent working layer. Chromatography

Chromatographic separation by the method of RP HPLC was performed on an “Agilent Technologies 1200 Infinity” device (USA). Electronic spectra were recorded using an Agilent 1200 series diode array detector.

The separation was carried out on an Ascentis express C18 2.7 $\mu\text{m} \times 100$ mm \times 4.6 mm steel column.

The mobile phase composition included: 1% aqueous solution of formic acid (A) and ethyl spirit (B). The elution was carried out under the following conditions:

Flow rate: 0.5 ml/min

Column temperature: 35°C

Detection: 284, 288, 296 nm

Injection volume: 1 μl

The elution was carried out in a gradient mode shown in Table 2.

was carried out in an ascending manner under standard conditions.

The object being analyzed at the concentration of 0.5% was dissolved in water and applied with a microsyringe in the amount of 2 μl on the start line. The binary system isopropanol – water in the ratio of 2:1 was used as the mobile phase.

To detect the glutathione adsorption zones and impurities on the chromatogram, derivatization by treating the chromatograms with 0.5% spirit solution of ninhydrin followed by heating in a drying cabinet at $t = 100^\circ\text{C}$ for 5 minutes was used. Hereby, the adsorption zones of glutathione and impurities appeared as red-and-violet spots.

RESULTS AND DISCUSSION. Since specific impurities in glutathione are dipeptides and amino acids, they, like glutathione itself, can react with dancil chloride to form dancil derivatives which can be further determined during chromatographic separation by RP HPLC method.

As a result of RP-HPLC chromatography of glutathione derivatized by dancyl chloride it was established that this reaction allows detecting impurities in glutathione (Figure 1).

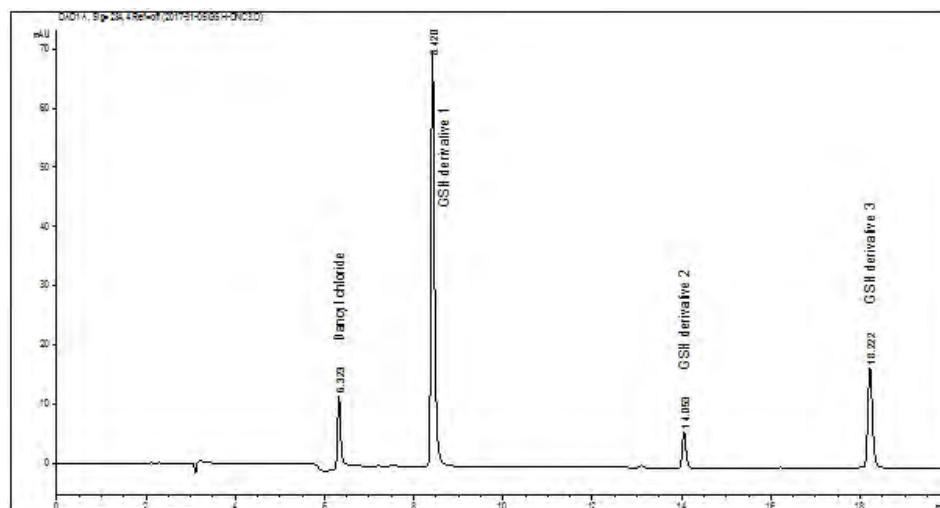


Figure 1 – Chromatogram of dancilchloride derivatives of glutathione

The chromatogram shows three derivatives with retention times of 8.4, 14.053 and 18.2 minutes. Moreover, the component with retention time of 8.4 minutes

belongs to pure glutathione which is confirmed by standard sample chromatography (SS (standard sample)) of glutathione devoid of impurities (Figure 2).

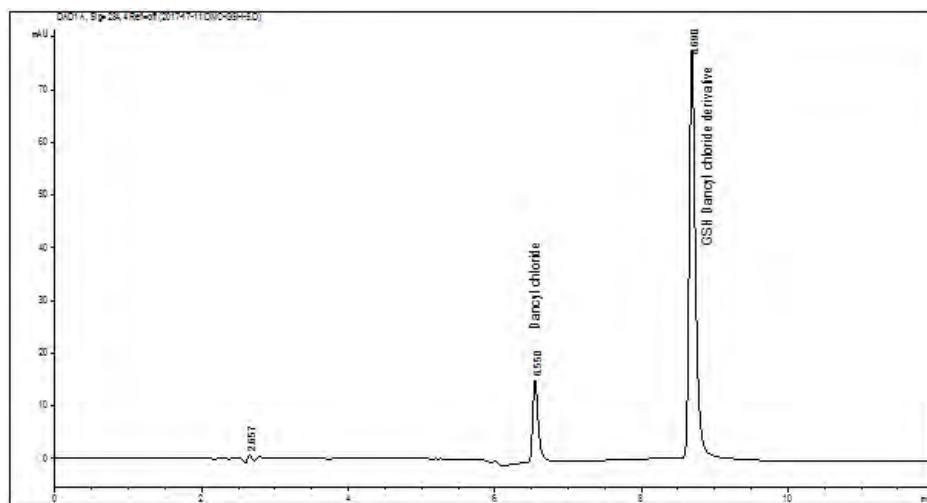


Figure 2 – Chromatogram of glutathione standard sample (without impurities)

The remaining components are impurities in the glutathione sample being analyzed.

The UV spectra of all derivatives are shown in Figure 3.

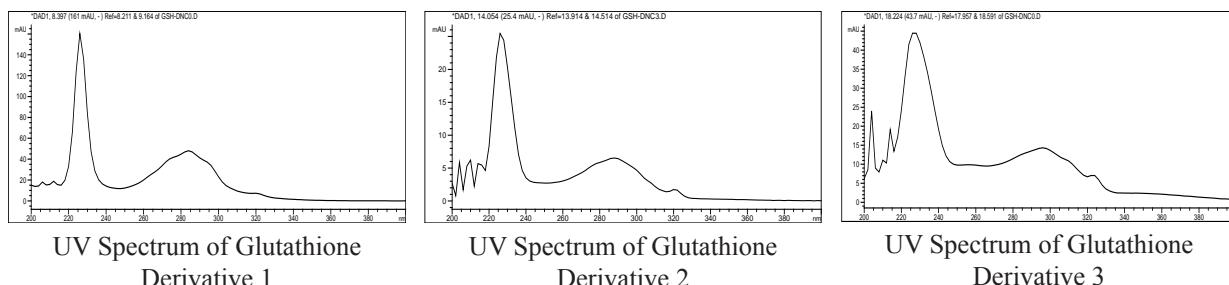


Figure 3 – UV Spectra of Glutathione Derivatives

The resulting derivatives presented in the figure, are somewhat different from each other in their UV spectra. Glutathione derivative 1 had an absorption maximum at $\lambda_{\text{max}} = 284 \text{ nm}$. The derivatives belonging to specific glutathione impurities absorb at $\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$ (Derivative 2) and $\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$ (Derivative 3). The

derivative with the retention time of 14.053 min. was identified as cysteine, and the component with the retention time of 18.222 min. was identified as oxidized glutathione.

The calculated parameters of the chromatographic system suitability are presented in Table 3.

Table 3 – Chromatographic system suitability parameters for the impurities determination in glutathione with help of dancil chloride derivatization

t_R	Area	N	R_s	T_f	W_b
8.42	386.60	62598	16.39	0.68	0.0792
14.053	36.40	150256	40.22	0.73	0.2667
18.222	121.05	156705	25.30	0.81	0.1083

Note: tR is the absolute retention time, N is the number of theoretical plates, Rs is the peak separation factor, T_f is the asymmetry coefficient, W_b is the peak width on the baseline

According to the data obtained, the test conditions to verify the suitability of the chromatographic system were compiled.

Preparation of the solution to verify the suitability of the chromatographic system. 0.025 g of cysteine

and 0.025 g of glutathione reconstituted substance were placed in a volumetric flask with a capacity of 25.0 ml, then dissolved in 10 ml of 0.05 M sodium tetraborate solution. After that the solution volume was brought to the necessary mark with the same solvent and mixed up.

The chromatographic system is considered suitable if the following conditions on the reference solution chromatograms are satisfied:

- the effectiveness of the chromatographic column calculated from the peak of the dancil glutathione derivative must be at least 56,000 theoretical plates;
- the peaks separation coefficient of the dancil glutathione derivative and cysteine must be at least 15;
- the relative standard deviation of the peak area of the DNC-glutathione derivative should be not more than 2.0%;
- the symmetry coefficient peak of the DNC-glutathione derivative on the chromatograms of the tested

solution and the glutathione reference solution should be from 0.6 to 1.0.

The glutathione detection limit for this technique with the required accuracy and precision is 0.001%. On the chromatogram obtained during the quantitative determination, the content of oxidized glutathione should be not more than 1.5%. The content of other impurities should not exceed 0.5%. The total content of impurities should not exceed 2.5%.

The data obtained with the help of RP HPLC, were confirmed during the chromatography carried out by TLC method. Figure 4 shows the chromatogram of glutathione containing impurities.



Figure 4 – TLC chromatogram of glutathione with impurities

The figure shows 3 zones of adsorption, two of which belong to impurities.

The component with the mobility coefficient of $R_f=0.35$ having a red-violet coloring belongs to glutathione. The components with R_f values of 0.45 (pale red) and 0.3 (brown) belong to impurities.

In the course of the studied data base on the analytical approaches to the detection of the impurities in the glutathione substance proposed by foreign pharmacopoeias including such authoritative as European and British ones, it has been found out that these sources regulate testing the purity of glutathione by capillary electrophoresis. Although this method is effective it is not so often involved in routine analytical work so its use to determine impurities in glutathione can cause some difficulties. For the determination of impurities in glutathione, Japanese Pharmacopoeia implies HPLC with UV detection at the wavelength of 210 nm. The sensitivity and reliability of this approach are open to question since all the impurities determined in glutathione, are aliphatic amino acids and peptides which are absorbed very weakly in the UV spectrum. The regulated wavelength (210 nm) is not specific for these compounds either, since most of the known organic compounds including solvents are absorbed within this spectrum.

In Russian analytical laboratories, the RP-HPLC method is still the priority means meeting the requirements of pharmaceutical analysis completely. Therefore, almost the entire methodological framework for most medicinal substances is adapted specifically to

this method. At the same time, the method of thin-layer chromatography remains actual for the determination of impurities. That is why the suggested method, i.e. the combination of pre-column derivatization with dancil chloride followed by the RP-HPLC determination and thin-layer chromatography for the determination of impurities in glutathione, can be easily put into practice in almost any laboratory. It is distinguished by the absence of a complex sample preparation, sensitivity and rapidity. In addition, the pre-column derivatization with dancil chloride followed by RP-HPLC chromatographic determination, can be also used for authenticity and quantitative determination of glutathione. Therefore, this analytical approach can be considered universal.

CONCLUSION. As a result of the carried out research, the methods for determining impurities in the glutathione substance on the basis of RP HPLC methods with preliminary derivatization with dancil chloride and TLC with ninhydrin detection have been developed. A comparative analysis of the obtained results suggests that the RP-HPLC method with pre-column derivatization is more reliable since it is more sensitive to impurities and also makes it possible to study the UV profiles of impurity components better than the TLC method. That is why it is more preferable to use RP-HPLC with pre-column derivatization for the detection of impurities in the glutathione substance. The results of this study can be recommended for inclusion into the regulatory documentation on glutathione in the section “Impurities”.

Библиографический список

1. Deonte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. – 2013. – T. 1830, №5. – C. 3217–3266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
2. Kojer K., Bien M., Gangel H., Morgan B., Dick T.P., Riemer J., Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state // The EMBO Journal. – 2012. – T. 31, №14. – C. 3169–3182. DOI: [10.1038/emboj.2012.165](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.165).
3. Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D., Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation // Antioxid Redox Signal. – 2008. – T. 10, №11. – C. 1941–1988. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>.

4. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2005. – Т. 45. – С. 51–88. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
5. Yu B.P., Chung H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging // *Mech Ageing Dev.* – 2006. – Т. 127, №5. – С. 436–443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.01.023>.
6. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Mol Aspects Med.* – 2009. – Т. 30, №1–2. – С. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
7. Boyland E., Chasseaud L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* – 1969. – Т. 32. – С. 173–219.
8. Zimmermann A.K., Loucks F.A., Schroeder E.K., Bouchard R.J., Tyler K.L., Linseman D.A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria // *J Biol Chem.* – 2007. – Т. 282, №40. – С. 29296–29304. DOI: 10.1074/jbc.M702853200.
9. Woodbridge J.E. Princeton N.J. Патент США: US3864085A. Glutathione reagent and test method. Дата: 31.10.1973.
10. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch Biochem Biophys.* – 1959. – Т. 82, №1. – С. 70–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
11. Agrawal S.B., Agrawal M., Lee E.H., Kramert G.F., Pillai P. Changes in polyamine and glutathione contents of a green algae, Chlorogonium elongatum (Dang) France exposed to mercury // *Environ. Exp. Botany.* – 1992. – Т. 32, №2. – С. 145–151. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90039-5).
12. Hissin P.J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // *Anal Biochem.* – 1976. – Т. 74, №1. – С. 214–226. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
13. Sutariya V., Wehrung D., Geldenhuys W.J. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione // *J. Chromatogr. Sci.* – 2012. – Т. 50, №3. – С. 271–276. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
14. Di Pietra A.M., Gotti R., Bonazzi D., Andrisano V., Cavrini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid // *J Pharm Biomed Anal.* – 1994. – Т. 12, №1. – С. 91–98. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)80015-4](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)80015-4).
15. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Fanti P., Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide // *Nat Protoc.* – 2013. – Т. 8, №9. – С. 1660–1669. DOI: 10.1038/nprot.2013.095.
16. Iwasaki Y., Saito Y., Nakano Y., Mochizuki K., Sakata O., Ito R., Saito K., Nakazawa H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples // *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed LifeSci.* – 2009. – Т. 877, №28. – С. 309–3317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.001>
17. Lee S.G., Yim J., Lim Y., Kim J.H. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress // *J. Chromatogr. B.* – 2016. – Т. 1019. – С. 45–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.041>.
18. Gawlik M., Krzyżanowska W., Gawlik M.B., Filip M. Optimization of determination of reduced and oxidized glutathione in rat striatum by HPLC method with fluorescence detection and pre-column derivatization // *Acta Chromatographica.* – 2014. – Т. 26, №2. – С. 335–345. DOI: <https://doi.org/10.1556/AChrom.26.2014.2.10>.
19. Bald E., Głowiak R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection // *Amino Acids.* – 2005. – Т. 28, №4. – С. 431–433. DOI: 10.1007/s00726-005-0195-8.
20. Safavi A., Maleki N., Farjam E., Mahyari F.A. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode // *Anal Chem.* – 2009. – Т. 81, №18. – С. 7538–7543. DOI: 10.1021/ac900501j.
21. Raoof J.B., Ojani R., Karimi-Malek H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor // *J Appl Electrochem.* – 2009. – Т. 39, №8. – С. 1169–1175. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-009-9781-x>
22. British Pharmacopoeia. Т.1. Her Majetys stationary office. – Лондон, 2005. – С. 924–926.
23. European Pharmacopoeia – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France, 2004. – С. 2727.
24. Japanese Pharmacopoeia. 17th edition. English version. The Ministry of health, labour and welfare. 2006 с.
25. Алексеева К.А., Писарев Д.И., Новиков О.О., Малотина А.Ю. Разработка методики предколоночной дериватизации глутатиона восстановленного 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом для определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Фармация и фармакология. – 2018. – Т. 6, №3. – С. 229–240. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240.
26. Шлатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии; АН ЛатвССР, Ин-т органич. синтеза. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
27. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. В 2-х ч. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. пер. со словац. – М.: Мир, 1980.

References

1. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* 2013;1830(5):3217–3266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
2. Kojer K, Bien M, Gangel H, Morgan B, Dick TP, Riemer J. Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *The EMBO Journal.* 2012;31:3169–82. DOI: [10.1038/emboj.2012.165](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.165).
3. Mieyal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(11):1941–88. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>.
4. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51–88. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
5. Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:436–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.01.023>.
6. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1–2):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
7. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol.* 1969;32:173–219.
8. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for BCL-2 antioxidant function at mitochondria // *J Biol Chem.* 2007;282(40):29296–304. DOI: [10.1074/jbc.M702853200](https://doi.org/10.1074/jbc.M702853200).
9. Woodbridge JE, Princeton NJ. Patent USA US3864085A. Glutathione reagent and test method. Priority date: 31.10.1973.
10. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
11. Agrawal SB, Agrawal M, Lee EH, Kramert GF, Pillai P. Changes in polyamine and glutathione contents of a green alga, Chlorogonium elongatum (Dang) France exposed to mercury. *Environ Exp Botany.* 1992;32(2):145–51. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90039-5).
12. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
13. Sutariya V, Wehrung D, Geldenhuys WJ. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(3):271–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr055>.
14. Di Pietra AM, Gotti R, Bonazzi D, Andrisano V, Cavrini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid. *J Pharm Biomed Anal.* 1994;12(1):91–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)80015-4](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)80015-4).
15. Giustarini D, Dalle-Donne I, Milzani A, Fanti P, Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc.* 2013;8(9):1660–9. DOI: [10.1038/nprot.2013.095](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095).
16. Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, Saito K, Nakazawa H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed LifeSci.* 2009;877(28):3309–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.001>.
17. Lee SG, Yim J, Lim Y, Kim JH. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to measure oxidized and reduced forms of glutathione in whole blood and verification in a mouse model as an indicator of oxidative stress. *J Chromatogr B.* 2016;1019:45–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.041>.
18. Gawlik M, Krzyżanowska W, Gawlik MB, Filip M. Optimization of determination of reduced and oxidized glutathione in rat striatum by HPLC method with fluorescence detection and pre-column derivatization. *Acta Chromatographica.* 2014;26(2):335–345. DOI: <https://doi.org/10.1556/AChrom.26.2014.2.10>.
19. Bald E, Głowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Amino Acids.* 2005;28(4):431–3. DOI: [10.1007/s00726-005-0195-8](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0195-8).
20. Safavi A, Maleki N, Farjami E, Mahyari FA. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode. *Anal. Chem.* 2009;81(18):7538–43. DOI: [10.1021/ac900501j](https://doi.org/10.1021/ac900501j).
21. Raoof JB, Ojani R, Karimi-Maleh H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor J Appl Electrochem. 2009;39(8):1169–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-009-9781-x>.
22. British Pharmacopoeia. Her Majetys stationary office, London, UK. 2005;1:924–926.
23. European Pharmacopoeia, 2014. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France: 2727.
24. Japanese Pharmacopoeia. 17th edition. English version. The Ministry of health, labour and welfare. 2062 p.
25. Alexeeva KA, Pisarev DI, Novikov OO, Malyutina AYu. Development of methods of pre-columnar derivatization of glutathiones recovered by 4-methoxy-2-nitrophenylisothiocyanate for determination by method of high-ef-

- fective liquid chromatography. *Pharmacy & Pharmacology*. 2018;6(3):229–240. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240.
26. Shatts VD, Sakhartova OV. *Vysokoeffektivnaya zhidkostnaya khromatografiya: Osnovy teorii. Metodologiya. Primenenie v lekarstvennoy khimii [High Performance Liquid Chromatography: Fundamentals of Theory. Methodology. Use in medicinal chemistry]*. AN LatvSSR, In-t organic synthesis. Riga: Zinatne, 1988. 390 p. Russian.
27. Sharshunova M, Schwartz V, Mihalets C. *Tonkosloynaya khromatografiya v farmatsii i klinicheskoy biokhimii. V 2-kh ch. [Thin-layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry. In 2 parts]*, translate from the Slovak. Moscow: Mir, 1980. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Авторы

Алексеева Ксения Александровна – аспирант 3 года обучения кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0002-0711-3505. E-mail: 740890@bsu.edu.ru

Писарев Дмитрий Иванович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0002-2996-7712. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Малютина Анастасия Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей химии ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. ORCID: 0000-0001-6170-2151. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Бойко Николай Николаевич – кандидат фармацевтических наук, младший научный сотрудник научно-образовательного центра «Фармация», ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтические процессы, фитотехнология. ORCID: 0000-0001-9222-2935. E-mail: boykoniknik@gmail.com

Authors

Alekseeva Kseniya Aleksandrovna – a post-graduate student of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0002-0711-3505. E-mail: 740890@bsu.edu.ru

Pisarev Dmitriy Ivanovich – PhD (Pharmacy), Associate Professor, Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0002-2996-7712. E-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Malyutina Anastasiya Yurevna – PhD (Pharmacy), Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. ORCID: 0000-0001-6170-2151. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Boyko Nikolay Nikolaevich – PhD (Pharmacy), junior research scientist of Scientific and Educational Centre “Pharmacy”, Belgorod State Research University. Research interests: pharmaceutical processes, phytotechnology. ORCID: 0000-0001-9222-2935. E-mail: boykoniknik@gmail.com

Поступила в редакцию: 23.10.2018

Received: 23.10.2018

Отправлена на доработку: 21.11.2018

Sent back for revision: 21.11.2018

Принята к печати: 10.12.2018

Accepted for publication: 10.12.2018