

УДК 543.544



РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРЕКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО 4-МЕТОКСИ-2-НИТРОФЕНИЛ-ИЗОТИОЦИОНАТОМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

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

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

E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

В настоящее время активно исследуется фармакологическая роль глутатиона в терапии канцерогенеза, нервно-дегенеративных и глазных болезней, заболеваний сердца, иммунной системы и старения организма. Поэтому для разработки фармацевтических объектов на его основе необходимо создание оптимальной аналитической базы. **Целью** настоящего исследования является разработка методики анализа глутатиона восстановленного с помощью предколоночной дериватизации 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом. **Материалы и методы.** Поскольку глутатион не имеет необходимых спектральных характеристик для непосредственного анализа, то исходя из этого, разработана методика определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом методом обращенно-фазной высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Детекцию образовавшегося деривата проводили по поглощению в УФ-свете с помощью диодно-матричного детектора. **Результаты и обсуждение.** В ходе описанного эксперимента, были получены хроматограммы деривата глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом. Данную методику также оценивали на возможность количественного определения глутатиона. Чувствительность методики составила 0,01% или $3,1 \cdot 10^{-1}$ моль. Прямолинейная зависимость между аналитическим сигналом (площадь пика) и концентрацией наблюдалась в диапазоне 0,01–0,08%, коэффициент корреляции – 0,995. **Заключение.** В ходе проведенных исследований разработана методика определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом методом ОФ ВЭЖХ. При этом образуется дериват со временем удерживания 22,3 мин и максимумом поглощения 398 нм. Также данная методика позволяет оценить количественное содержание исследуемого объекта.

Ключевые слова: глутатион восстановленный, 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианат, обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, дериватизация

DEVELOPMENT OF METHODS OF PRE-COLUMNAR DERIVATIZATION OF GLUTATHIONES RECOVERED BY 4-METHOXY-2-NITROPHENYL-ISOTHIOTOCIONATE FOR DETERMINATION BY METHOD OF HIGH-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

K.A. Alexeeva, D.I. Pisarev, O.O. Novikov, A.Yu. Malyutina

FSAEI HE Belgorod National State Research University of the Russian Federation,

85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

Nowadays the pharmacological role of glutathione in the therapy of carcinogenesis, neurodegenerative and ocular diseases, heart diseases, the immune system and aging of the organism is being actively investigated. Therefore,

Для цитирования:

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

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРЕКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИИ ГЛУТАТИОНА ВОССТАНОВЛЕННОГО 4-МЕТОКСИ-2-НИТРОФЕНИЛ-ИЗОТИОЦИОНАТОМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

Фармация и фармакология. 2018;6(3):229-240.

DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240

© Алексеева К.А., Писарев Д.И., Новиков О.О., Малютина А.Ю., 2018

For citation:

Alexeeva K.A., Pisarev D.I., Novikov O.O., Malyutina A.Yu.

DEVELOPMENT OF METHODS OF PRE-COLUMNAR DERIVATIZATION OF GLUTATHIONES RECOVERED BY 4-METHOXY-2-NITROPHENYL-ISOTHIOTOCIONATE FOR DETERMINATION BY METHOD OF HIGH-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(3):229-240. (In Russ).

DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240

for the development of pharmaceutical medical forms on its basis, it is necessary to create an optimal analytical base. **The aim** of this study is to develop a methodology for the analysis of glutathione recovered by pre-columnar derivatization of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate. **Materials and methods.** Since glutathione does not have the necessary spectral characteristics for its direct analysis, a methodology for the determination of glutathione with the use of pre-columnar derivatization of 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate by reversed-phase high-performance chromatography (RP HPLC) has been developed on that basis. Detection of the resulting derivative has been carried out by absorption in UV light using a diode array detector. **Results and discussion.** In the course of the experiment described, chromatograms of a glutathione derivative with 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate were obtained. This technique was also evaluated for the possibility of quantitative determination of glutathione. The sensitivity of the methods was 0.01% or $3.1 \cdot 10^{-1}$ mol. The linear relationship between the analytical signal (peak area) and concentration was observed within the range of 0.01–0.08% and the correlation coefficient of 0.995. **Conclusion.** In the course of the studies, a methodology for the determination of glutathione has been developed with the use of pre-columnar derivatization of 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate by RP HPLC. In this case, the derivative is formed with the retention time of 22.3 minutes and the absorption maximum of 398 nm. This method also allows estimating the quantitative content of the object under study.

Keywords: reduced glutathione, 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate, reversed-phase high-performance liquid chromatography, derivatization

ВВЕДЕНИЕ. Глутатион – трипептид, образованный тремя аминокислотами: глутаминовой кислотой, цистеином и глицином. Эта молекула принимает участие в поддержании редокси-потенциала клеток, в процессе обезвреживания ксенобиотиков различного происхождения, участвуя как в качестве непосредственного конъюгирующего агента, так и ко-фактора ряда ферментных систем биотрансформации [1]. Важность этого трипептида для человека обусловлена тем, что изменение любых гомеостатических параметров организма: возраст, активизация иммунных процессов, возникновение практически всех острых и хронических заболеваний сопровождаются сдвигами в синтезе глутатиона и, как следствие, трансформации окислительного статуса [2]. Физиологическая функция глутатиона реализуется несколькими путями: обезвреживание токсичных электрофильных частиц, путем непосредственного контакта с активными формами кислорода, и активация ферментов биотрансформации, а именно глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы [3, 4].

Глутатион является стабилизатором тиольного статуса белков, являясь вместилищем цистеина. Он также координирует процессы синтеза ДНК и иммунитета [5, 6], помогает поддерживать постоянный уровень оксида азота (NO) [7], преобразует активность белков через S-глутатионилирование [8] и рецепторов нейромедиаторов [9]. В митохондриях глутатион регулирует апоптоз, сдерживая некротические процессы, в ядре является регулятором пролиферации [10].

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

В научной литературе для анализа глутатиона описан ряд аналитических методов.

В настоящее время известны такие методы, как:

– **спектрофотометрический метод определения глутатиона**, основанный на взаимодействии 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислоты (DTNB) с SH-группой GSH. В результате реакции образуется хромофор 5-тио-2-нитробензойная кислота (TNB) с максимумом оптической плотности при 412 нм [11].

– **спектрофлуориметрический метод определения глутатиона**. Метод основан на взаимодействии *o*-фталевого альдегида (OPT) с SH-группой GSH, в результате формируется флуоресцентный конъюгат [12, 13].

– **определение глутатиона с помощью спектрофотометрического метода с реактивом Элмана**. На сегодняшний день метод с реактивом Элмана является одним из наиболее используемых подходов для выявления глутатиона, несмотря на то, что он дает приблизительную оценку содержания глутатиона [14].

– **определение глутатиона методом жидкостной хроматографии**. Метод основан на использовании жидкостной хроматографии с различными детекторами [15].

Для идентификации глутатиона, сопряжённого с белками, для обнаружения его в связанной или свободной формах в органах и клетках, используется жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией и тандемной масс-спектрометрией [16].

В качестве хроматографических реагентов дериватизации для ВЭЖХ-анализа глутатиона в биологических образцах предложены этакриновая кислота и ее метиловый эфир [17].

Поскольку глутатион является маркером окислительного стресса то в крови и других тканях его определяют путем дериватизации с алкилирующим агентом *N*-этилмалеимидом, предотвращающим автоокисление глутатиона. Конъюгат затем определяют методом ВЭЖХ [18], или с использованием жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии [19]. Данный подход также используется для определения глутатиона в стриатуме мозга крыс линии *Wistar* [20].

Существует методика совместного анализа глутатиона и его предшественников – цистеина, цистеинилглицин и гомоцистеина в слюне, заключающаяся в восстановлении дисульфидов в тиолы и количественном определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [21, 22].

Предложено непосредственное электрохимическое определение глутатиона и глутатиона восстановленного [23, 24].

Описанный ряд методик анализа глутатиона, в основном, касается его непосредственного определения в биологических объектах, однако для целей фармацевтического анализа они малоприменимы.

Опираясь на вышесказанное, **ЦЕЛЬЮ** настоящего исследования явилась разработка оптимальной методики анализа глутатиона, позволяющей оценить его качество в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объекта исследования использован глутатион восстанов-

ленный (CAS №70-18-8, ЕС № 2007254, *Applichem*, Германия).

Хроматографическое разделение 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 2,7μm × 100 мм × 4,6 мм*.

Состав мобильной фазы включал (А) – 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: 398 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. Ввиду отсутствия у него собственного поглощения в ультрафиолетовой области спектра нами разработан анализ глутатиона методом ОФ ВЭЖХ посредством его химической модификации. Популярным реактивом, способствующим получению хромофоров, является фенилизотиоцианат. Однако, нами для проведения дериватизации использован 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианат, который является производным фенилизотиоцианата, обладающим более активными сорбционными свойствами в отношении УФ-света. Методика заключается в использовании предколонной дериватизации исследуемой молекулы 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом. При этом происходит непосредственная химическая реакция глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом в щелочной среде, поскольку реакция идёт по типу электрофильного замещения. В результате структура глутатиона, претерпевая химическое превращение, приобретает хромофорную метку, сигнал которой можно зарегистрировать с помощью диодно-матричного детектора в ходе ВЭЖХ-анализа.

Методика дериватизации глутатиона

Для получения производного глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом предварительно были приготовлены растворы 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата и глутатиона.

Для приготовления раствора 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата были использованы такие растворители как ацетон, ацетонитрил и этанол. Наибольшую растворимость 4-метокси-2-нитрофе-

нил-изотиоцианат показал в этаноле, поэтому в дальнейшем в качестве растворителя использовали спирт этиловый.

Таким образом, для приготовления раствора 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата около 0,025 г реактива переносили в мерную колбу объёмом 25 мл, прибавляли 10 мл этанола, встряхивали до полного растворения, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

Поскольку реакция взаимодействия аминокислот с 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом происходит по типу электрофильного замещения, то для протекания данной реакции требуется щелочная реакция среды. Поэтому для приготовления раствора глутатиона использовали 0,05 Н раствор натрия тетрабората.

0,025 г испытуемого образца глутатиона помещали в мерную колбу, объёмом 25 мл, приливали 10 мл 0,05 Н раствора тетрабората натрия, взбалтывали до полного растворения вещества и раствор доводили до метки тем же растворителем, перемешивали.

2 мл приготовленного раствора глутатиона помещали в мерную колбу, вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 0,1%-ного раствора 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата, взбалтывали. Полученный раствор доводили до метки этанолом, 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В ходе описанного эксперимента, были получены хроматограммы деривата глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианатом.

Реагент – 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианат в указанной системе характеризуется наличием одного пика со временем удерживания 33,97 мину-

ты. УФ-спектр 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата наблюдается при длине волны $\lambda_{\max} = 410$ нм (рис. 1).

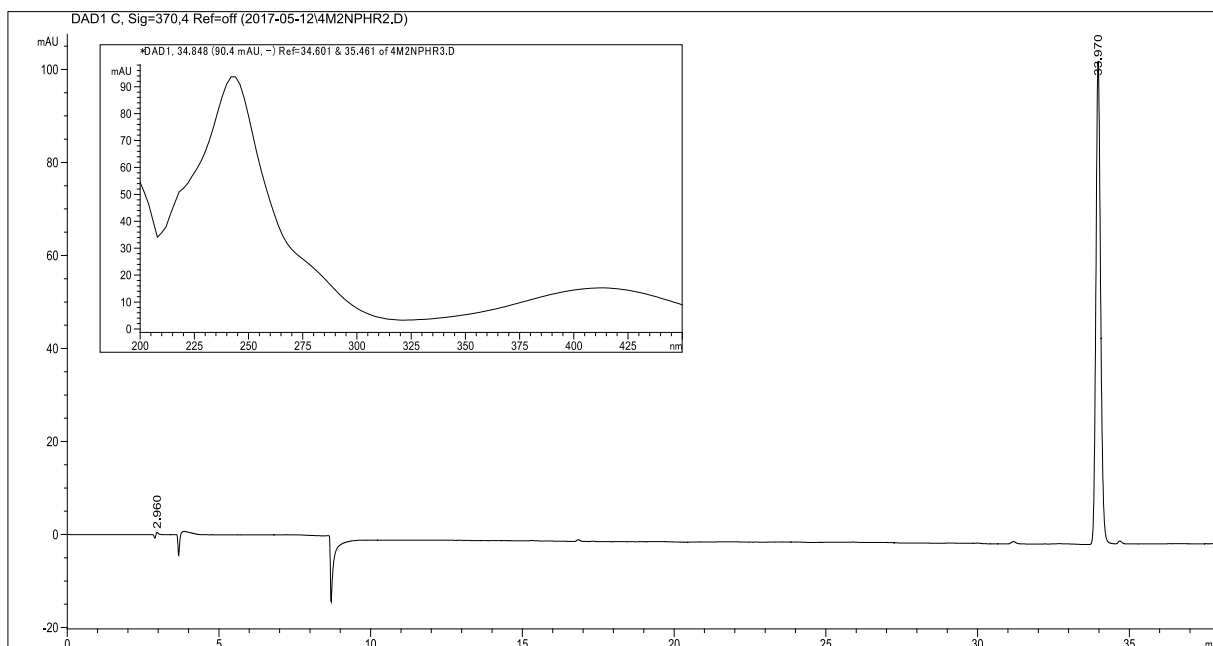


Рисунок 1 – Хроматограмма и УФ-спектр 4-метокси-2-нитрофенил-изотиоцианата

При дериватизации глутатиона обнаруживается производное со временем удерживания 22,3 мин

(рис. 2). На хроматограмме деривата глутатиона также отмечается пик свободного реагента.

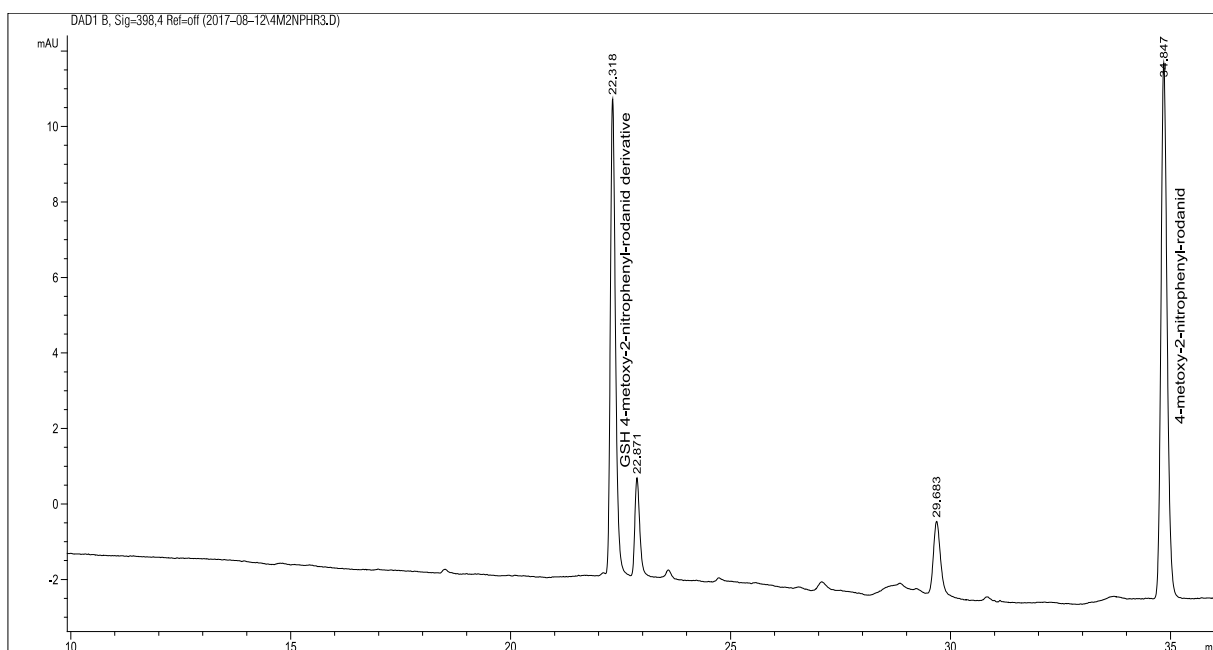


Рисунок 2 – Хроматограмма деривата глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-роданином

На рисунке 3 представлен УФ-спектр деривата глутатиона с 4-метокси-2-нитрофенил-родани-

ном, который имел максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 398$ нм.

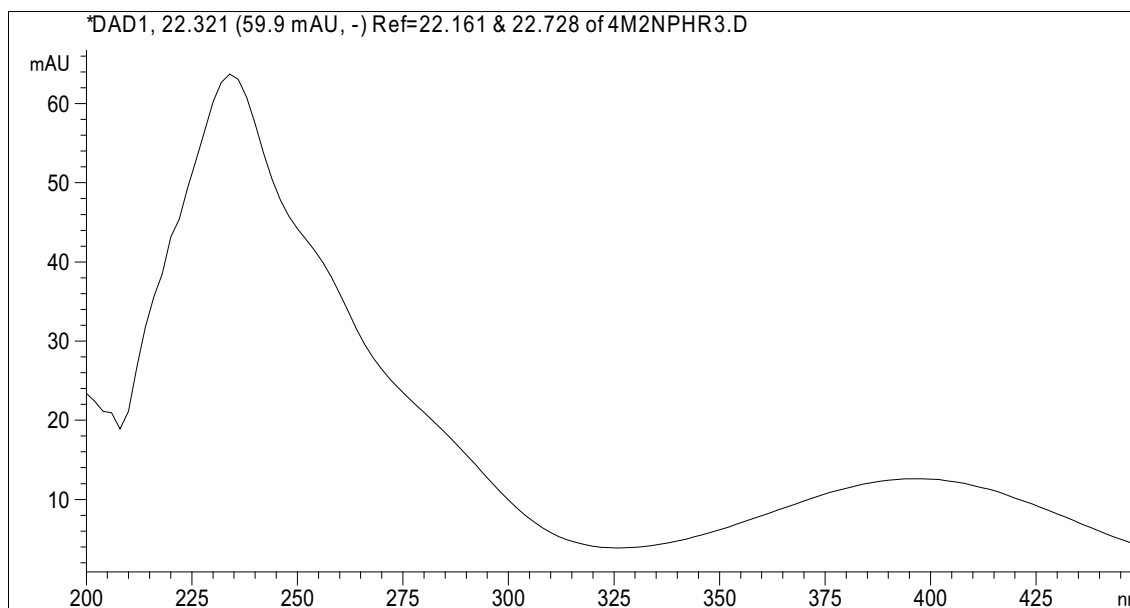


Рисунок 3 – УФ-спектр деривата глутатиона с 4-метокси-2фенил-роданидом

Расчёты параметров пригодности использованной хроматографической системы приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры пригодности хроматографической системы для определения деривата глутатиона

	t_R	N	R_s	T_f	W_b
Дериват	22,318	186447	2,75	0.724	0.1242

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

Приведённые в таблице 2 результаты расчёта критериев пригодности ($N > 5000$, $R_s > 1,5$, $T_f < 2$), укладываются в рекомендуемые Европейской Фармакопеей параметры пригодности [25]. Таким образом, представленная хроматографическая система может быть признана приемлемой для определения дериватов глутатиона.

Для оценки возможности использования данной методики в целях количественного определения глутатиона была определена прямолинейная зависимость между концентрацией деривата глутатиона и аналитическим сигналом (площадь пика). Для этого готовили ряд из 6 калибровочных растворов дериватов глутатиона в диапазоне концентраций 0,01–0,08%. Полученные калибровочные растворы хроматографировали в приведённых выше условиях. По результатам хроматографирования был построен градуировочный график зависимости концентрации деривата глутатиона от площади пика (рис. 4).

Обнаруживаемый минимум для определения деривата глутатиона – 0,01%.

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

$$y = 8571,8x - 3,3753$$

Коэффициент корреляции составил 0,9998, что свидетельствует о наличии прямолинейной зависимости значений между площадью пика и содержанием деривата глутатиона.

Биологически активные пептиды, в том числе глутатион, представляют достаточно сложный объект для анализа, поскольку не способны поглощать свет. Поэтому сложность регистрации глутатиона в ходе самого важного в фармацевтическом анализе УФ-спектрофотометрического метода обуславливается тем, что он не имеет хромофоров. Однако высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричной детекцией даёт возможность проанализировать глутатион за счёт его предварительной дериватизации с приобретением хромофорной метки перед непосредственным разделением на колонке. Для дериватизации глутатиона разработан ряд методик, где в качестве дериватирующих агентов используют ряд традиционных реактивов, например, 2,4-динитрохлорбензол, 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота, о-фталевого альдегид, реактив Элмана. Нами впервые предложена методика дериватизации глутатиона 4-метокси-2фенил-роданидом с последующим хроматографическим разделением с помощью жидкостной хроматографии. Среди достоинств данной методики по сравнению с описанными в литературе, являются следующие:

- образуется только один дериват;
- дериват и дериватирующий агент хорошо разделяются на хроматограмме;
- дериват и дериватирующий агент имеют чётко различимые полосы поглощения;
- реакция дериватизации протекает достаточно быстро;
- продукт стабилен во времени;
- реакция достаточно чувствительна;
- существует прямолинейная зависимость между аналитическим сигналом и концентрацией аналита.

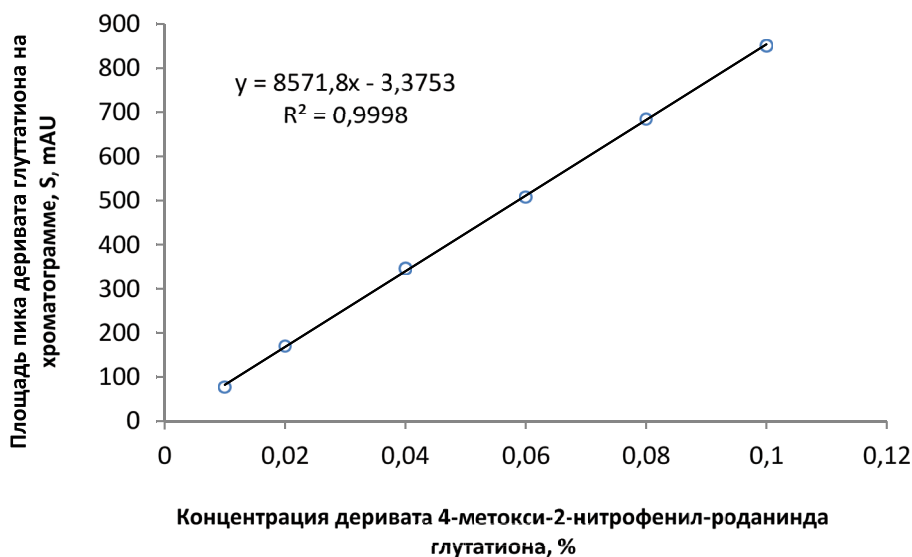


Рисунок 4 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации деривата глутатиона

Вышеперечисленные достоинства позволяют рекомендовать дериватизацию глутатиона 4-метокси-2-фенил-роданидом для идентификации и количественного определения глутатиона в разрабатываемых фармацевтических композициях и биофармацевтических исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В ходе проведённых исследований разработана методика определения глутатиона с помощью предколоночной дериватизации 4-ме-

токси-2-нитрофенил-изотиоцианатом методом ОФ ВЭЖХ. При этом образуются дериват со временем удерживания 22,3 мин и максимумом поглощения – 398 нм. Также данная методика позволяет оценить количественное содержание исследуемого объекта. Чувствительность определения составила 0,01%. Прямолинейная зависимость между аналитическим сигналом (площадь пика) и концентрацией наблюдалась в диапазоне 0,01–0,08%.

INTRODUCTION. Glutathione is a tripeptide formed by three amino acids: glutamic acid, cysteine and glycine. This molecule takes part in maintaining the redox potential of cells, in the process of neutralizing xenobiotics of various origin, participating both as a direct conjugating agent and a co-factor of a number of enzyme biotransformation systems [1]. The importance of this tripeptide for humans is due to the fact that changes in any homeostatic parameters of the body – age, activation of immune processes, the emergence of virtually all acute and chronic diseases – are accompanied by shifts in the synthesis of glutathione and as a consequence of transformation of the oxidative status [2]. The physiological function of glutathione is realized in several ways: neutralization of toxic electrophilic particles, by direct contact with active forms of oxygen and activation of biotransformation enzymes, i. e. glutathione peroxidase and glutathione transferase [3, 4].

Glutathione is a stabilizer of the thiol status of proteins, being a receptacle of cysteine. He also coordinates DNA synthesis and immunity [5, 6], helps maintain a constant level of nitric oxide (NO) [7], converts protein activity through S-glutathionylation [8] and neurotrans-

mitter receptors [9]. In mitochondria, glutathione regulates apoptosis, inhibiting necrotic processes, and in the nucleus it is a regulator of proliferation [10].

The described biological effects of glutathione underscore its potential therapeutic activity in the correction of numerous nosologies and indicate the promise of creating drugs based on it. To develop optimal pharmaceutical forms of glutathione, it is necessary to develop an effective method for its analysis.

A number of analytical methods for the analysis of glutathione have been described in the scientific literature.

The currently known methods are as follows.

Spectrophotometric method for the determination of glutathione, based on the interaction of 5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with the SH group GSH. As a result, the reaction forms the chromophore 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) with a maximum optical density at 412 nm [11].

Spectrofluorimetric method for the determination of glutathione. The method is based on the interaction of o-phthalaldehyde (OPT) with the GS-SH group, resulting in the formation of a fluorescent conjugate [12, 13].

Glutathione determination by spectrophotometric method with Ellman reagent. Nowadays, the Ellman reagent method is one of the most used approaches for the detection of glutathione, despite the fact that it provides an approximate estimate of the glutathione content [14].

Definitions of glutathione by liquid chromatography. The method is based on the use of liquid chromatography with various detectors [15].

To identify glutathione conjugated to proteins, liquid chromatography in combination with mass spectrometry and tandem mass spectrometry is used to detect it in bound or free forms in organs and cells [16].

As prechromatographic derivatization reagents for HPLC analysis of glutathione, ethacrynic acid and its methyl ester have been proposed in biological samples [17].

Since glutathione is a marker of oxidative stress, in blood and other tissues it is determined by derivatization with the alkylating agent N-ethylmaleimide, which prevents auto-oxidation of glutathione. Conjugate is then determined by HPLC [18] or by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [19]. This approach is also used to determine glutathione in the striatum of the brain of *Wistar* rats [20].

There is a technique of glutathione joint analysis and its precursors such as cysteine, cysteinylglycine and homocysteine in the saliva, which consists in restoring disulfides in thiols, derivatization of the 2-S-quinoline with 2-chloro-1-methyl-2-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and quantitative determination by high performance liquid chromatography [21, 22].

A direct electrochemical determination of recovered glutathione and glutathione has been proposed [23, 24].

A number of described glutathione analysis techniques is primarily concerned with its immediate determination in biological objects, but for certain reasons they are practically unsuitable for pharmaceutical analysis.

Based on the foregoing, THE AIM of the present study is to develop the optimal glutathione detection methods allowing to assess its quality in medicaments.

MATERIALS AND METHODS. As the object of the study, recovered glutathione was used (CAS №70-18-8, EC № 2007254, *Applichem*, Germany).

Chromatographic separation was carried out on the equipment "*Agilent Technologies 1200 Infinity*" (USA). Electronic spectra were recorded with the use of an *Agilent 1200* diode array detector.

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

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

Flow rate: 0.5 ml / min

Column temperature: 35°C

Detection: 398 nm

Volume of sample: 1 μl

The elution was carried out in the gradient mode shown in Table 1.

Table 1 – Conditions for the gradient elution of glutathione derivatives

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

Glutathione is a molecule that does not have significant chromophore fragments, suitable for the investigation by UV spectroscopy and HPLC with diode-matrix detection. Due to the lack of intrinsic absorption in the ultraviolet region of the spectrum, a glutathione analysis by RP HPLC by its chemical modification has been developed. The popular reagent that supports the production of chromophores is phenylisothiocyanate. However, for derivatization 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate was used, which is a phenylisothiocyanate derivative with more active sorption properties for UV light. The technique is in the use of pre-columnar derivatization of the molecule under study by 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate. In this case, a direct chemical reaction of glutathione with 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate takes place in an alkaline medium, since the reaction proceeds according to the type of electrophilic substitution. As a result, the structure of glutathione undergoes a chemical transformation and acquires a chromophore label the signal of which can be detected by a diode array detector during HPLC analysis.

Methods of glutathione derivatization

To prepare the glutathione derivative with 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate, solutions of 4-me-

thoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate and glutathione were previously prepared.

Solvents such as acetone, acetonitrile and ethanol were used to prepare a solution of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate. The highest solubility of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate was shown in ethanol, therefore, further on ethyl alcohol was used as a solvent.

Thus, to prepare a solution of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate, about 0.025 g of the reagent was transferred to a 25 ml volumetric flask, 10 ml of ethanol was added, shaken until completely dissolved, the volume of the solution was labeled with the same solvent and mixed.

Since the interaction of amino acids with 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate occurs as an electrophilic substitution, an alkaline reaction of the medium is required to proceed with this reaction. Therefore, 0.05 N sodium tetraborate solution was used to prepare the glutathione solution.

0.025 g of the test glutathione sample was placed in a volumetric flask, 10 ml of a 0.05N sodium tetraborate solution was poured into 25 ml of a volume, stirred until the substance was completely dissolved, and the solution was brought to the mark with the same solvent, and mixed.

2 ml of the prepared glutathione solution was placed in a 25 ml volumetric flask, 2 ml of a 0.1% solution of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate was added and agitated. The resulting solution was brought to the mark with ethanol, stirred and heated in an oven at the temperature of 80°C for 30 minutes. After the time was over, the solution was cooled down to the room temperature and chromatographed under the above conditions.

RESULTS AND DISCUSSION. In the course of

the described experiment, chromatograms of glutathione derivative with 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate were obtained.

The 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate reagent is characterized by the presence of a single peak with the retention time of 33.97 minutes. The UV spectrum of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate is observed at the wavelength at $\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$ (Fig. 1).

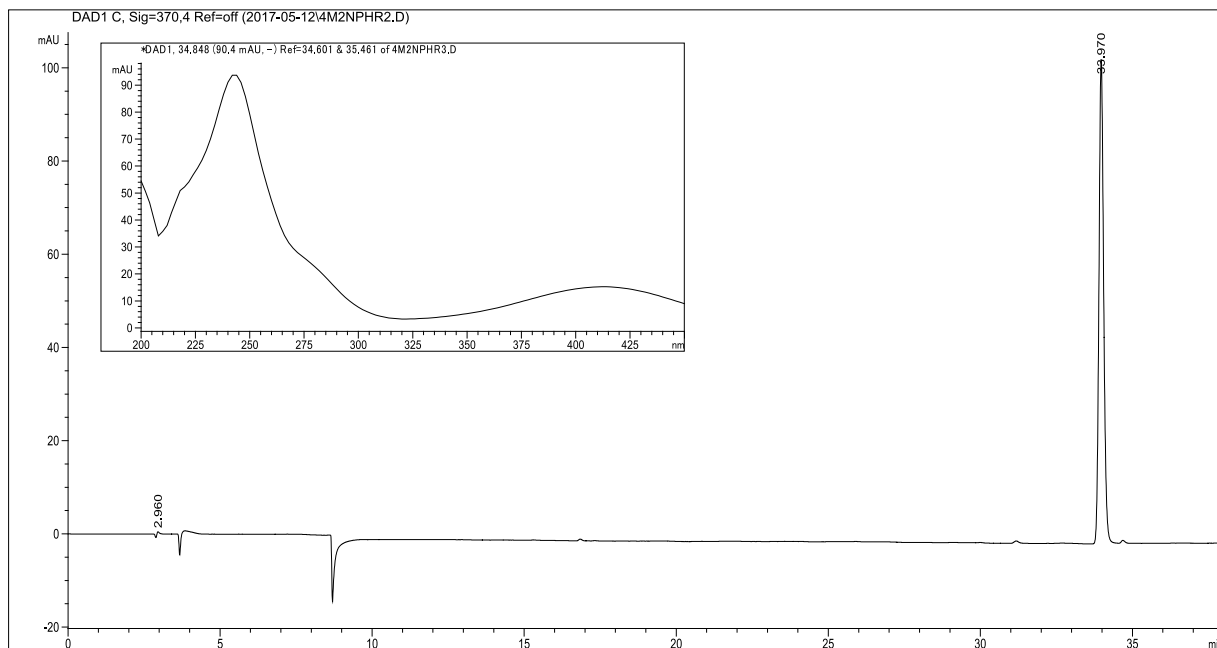


Fig. 1 – Chromatogram and UV spectrum of 4-methoxy-2-nitrophenyl isothiocyanate

In the derivatization of glutathione, a derivative is found with the retention time of 22.3 min (Fig. 2). The

chromatogram of the glutathione derivative also shows a peak of the free reagent.

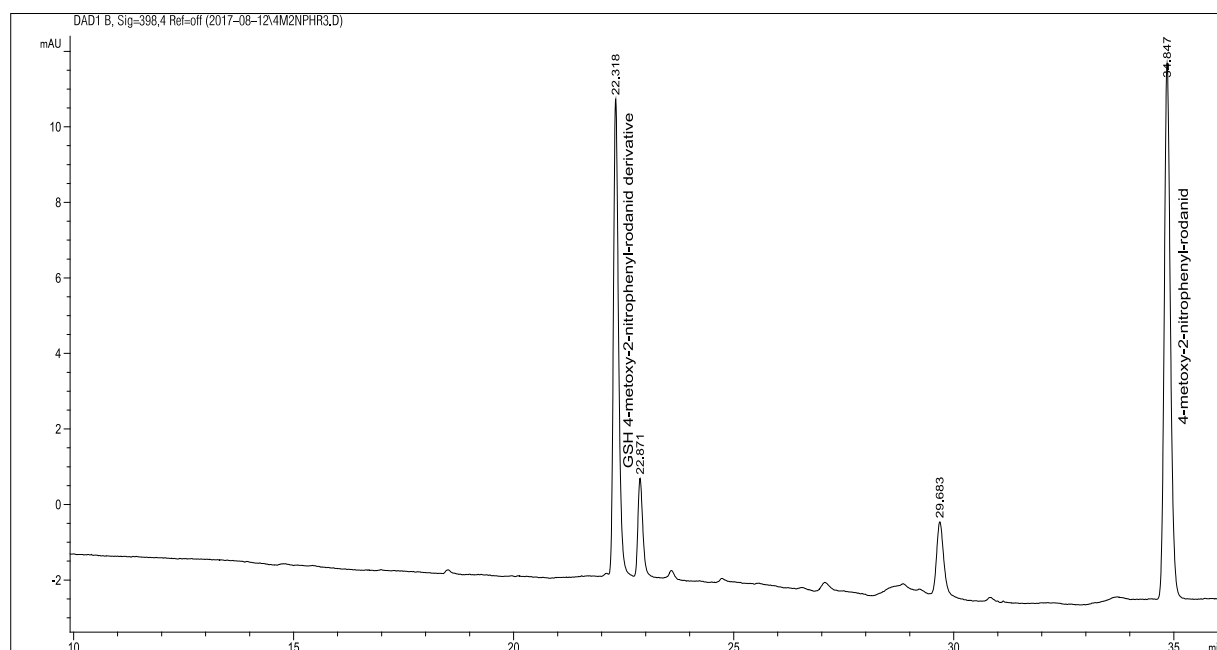


Fig. 2 – Chromatogram of glutathione derivative with 4-methoxy-2-nitrophenyl-rhodinide

Figure 3 shows the UV spectrum of the glutathione derivative with 4-methoxy-2-nitrophenyl-

rhodanide, which had an absorption maximum at $\lambda_{\max} = 398 \text{ nm}$.

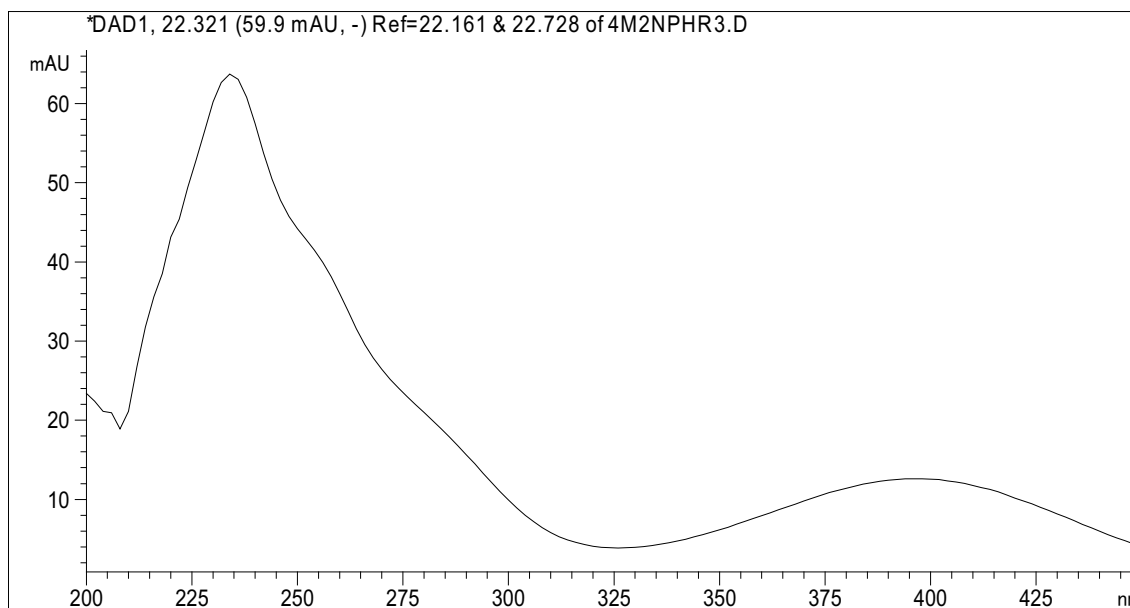


Fig. 3 – UV-spectrum of glutathione derivate with 4-methoxy-2-nitrophenyl-rhodinide

Calculations of the suitability parameters of the used chromatographic system are given in Table 2.

Table 2 – Parameters of chromatographic system suitability for determination of glutathione derivative

	t_R	N	R_s	T_f	W_b
Derivate	22.318	186447	2.75	0.724	0.1242

t_R – absolute retention time, N – number of theoretical plates, R_s – peak separation coefficient, T_f – asymmetry coefficient, W_b – peak width at baseline

The results of calculating the suitability criteria listed in Table 2 ($N > 5000$, $R_s > 1.5$, $T_f < 2$) fit into the recommended suitability parameters of the EF [25]. Thus, the present chromatographic system can be recognized as acceptable for the determination of glutathione derivatives.

To assess the possibility of using this method for the quantitative determination of glutathione, a direct relationship was established between the concentration of glutathione derivative and the analytical signal (peak area). To do this, a series of 6 calibration solutions of glutathione derivatives were prepared in the concentration range of 0.01–0.08%. The resulting calibration solutions were chromatographed under the conditions given above. Based on the results of chromatography, a calibration graph was constructed for the dependence of the concentration of glutathione derivative on the peak area (Fig. 4).

The detectable minimum for determination of glutathione derivative equals to 0.01%.

In the indicated range of concentrations, the calibration dependence was rectilinear. The regression equation looked like this:

$$y = 8571.8x - 3.3753$$

The correlation coefficient was 0.9998 which indicates the presence of a linear relationship between the peak area and the glutathione derivative content.

Biologically active peptides including glutathione are a fairly complex object for analysis, since they cannot absorb the light. Therefore, the complexity of recording glutathione during the most important in the pharmaceutical analysis of the UV spectrophotometric method is due to the fact that it does not have chromophores.

However, high-performance liquid chromatography with diode-matrix detection makes it possible to analyze glutathione due to its preliminary derivatization with the acquisition of the chromophore label before direct separation on the column. Several methods have been developed for the derivatization of glutathione, where a number of conventional reagents are used as derivatizing agents, for example 2,4-dinitrochlorobenzene, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, o-phthalaldehyde, Ellman's reagent. We first proposed a procedure for the derivatization of glutathione with 4-methoxy-2-phenyl-rhodanide followed by chromatographic separation using liquid chromatography. Among the merits of this technique in comparison with those described in the literature there are the following ones:

- only one derivate is produced;
- a derivate and a derivative agent are well-separated in a chromatogram;
- a derivate and a derivative agent have clearly distinguishable absorption bands;
- reaction of derivatization goes fast enough;

- the product is stable;
 - the reaction is sensitive;
 - there is a straight-line correlation between the analytical signal and the concentration of the sample.
- The the above mentioned advantages allow us to

recommend the derivatization of glutathione with 4-methoxy-2 phenyl-thiocyanate for the identification and quantitative estimation of glutathione in the framework of development of pharmaceutical compositions and biopharmaceutical studies.

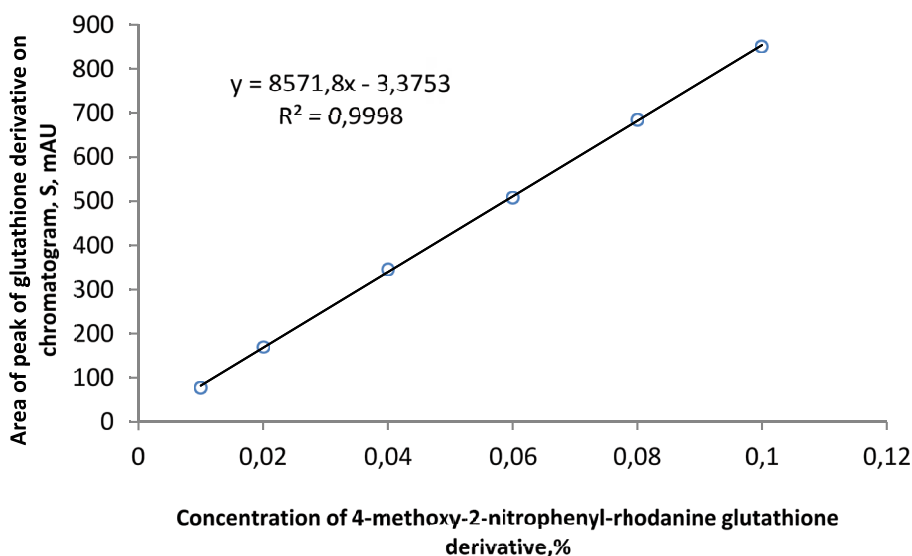


Fig. 4 – A calibration graph of dependence of the peak area on the concentration of glutathione derivate

CONCLUSION. In the course of the research, a methodology for the determination of glutathione has been developed with the use of pre-columnar derivatization of 4-methoxy-2-nitrophenyl-isothiocyanate by RP HPLC. In this case, the derivative is formed with the retention time of 22.3 minutes and the absorption

maximum of 398 nm. This method also allows estimating the quantitative content of the object under study. The sensitivity of the determination was 0.01%. The linear relationship between the analytical signal (peak area) and the concentration was observed in the range of 0.01–0.08%.

Библиографический список

1. Dickinson D.A., Forman H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism // *Biochem. Pharmacol.* 2012. Vol. 64. P. 1019–1026.
2. Forman H.J., Dickinson D.A. Oxidative signaling and glutathione synthesis // *Biofactors.* 2003. Vol. 17. P. 1–12.
3. Liu H., Wang H., Shenvis S., Hagen T.M., Liu R.M. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease // *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004. Vol. 1019. P. 346–349.
4. Wang H., Liu H., Liu R.M. Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice, *Exp. Gerontology.* 2003. Vol. 38. P. 507–517.
5. De Leve L., Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic GSH // *Sem.Liver.Dis.* 1990. Vol. 10. P. 251–266.
6. Meister A., Anderson M. E. Glutathione // *Ann.Rev.Biochem.* 1983. Vol. 52. P. 711–760.
7. Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols // *Ann.Rev. Pharmacol.Toxicol.* 2002. Vol. 42. Vol. 585–600.
8. Oja S.S., Janaky R., Varga V., Saranasaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione // *Neurochem.Int.* 2000. Vol. 37. P. 299–306.
9. Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. The changing faces of glutathione, a cellularprotagonist // *Biochem Pharmacol.* 2003. Vol. 66. P. 1499–1503.
10. Forman H.J., Zhang H., Rinn A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Mol.Aspects.Med.* 2009. Vol. 30. P. 1–12.
11. Woodbridge J.E. Glutathione reagent and test method. United States Patent: 3864085A. 1975.
12. Hissin P.J., Hilf R.A fluorometric method or determination of oxidized and reducedglutathione in tissues // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 74. P. 214–226.
13. Agrawal S.B., Agrawal M., Lee E.H., Kramert G.F. Changes in polyamine andglutathione contents of a green alga, *Chlorogonium elongatum* (dang) france exposedto mercury // *Environ.Exp.Botany.* 1992. Vol. 32. P. 145–151.
14. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch.Biochem.Biophys.* 1959. Vol. 82. P. 70–81.
15. 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. Vol. 50. Is. 3. P. 271–276.

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. Vol. 877. Is. 28. P. 3309–3317.
17. Di Pietra A.M., Gotti R., Bonazzi D., Andrisano V., Carvini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid // *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2013. Vol. 12. Is. 1. P. 91–98.
18. Giustarini, D., Dally-Donne I., Milzani A., Fanty P., Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide // *Nat.Protoc.* 2013. Vol. 8. P. 1660-1669.
19. Lee S., Yim J., Lim K., Kim J. 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. Vol. 1019. P. 45–50.
20. 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. Vol. 36. P. 335–345.
21. Bald E., Głowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection // *Amino Acids.* 2005. Vol. 28. Is. 4. P. 431–433.
22. Yan M., G.-B. Shi G., Sui Y., Guo T., Zhang J.-W., Fan S.-J. Determination of reduced glutathione in human plasma by RP-HPLC // *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army.* 2008. Vol. 3. P. 251–253.
23. Safavi A., Maleki N., Farjami E., Aghakhani Mahyari F. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode, *Analytical Chemistry.* 2009. Vol. 81. Is. 18. P. 7538–7543.
24. Raoof J., 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 // *Journal of Applied Electrochemistry.* 2009. Vol. 39. Is. 8. P. 1169–1175.
25. European Pharmacopoeia. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France; 2014. 2727 p.

References

1. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem.Pharmacol.* 2012;64:1019-26.
2. Forman HJ, Dickinson DA. Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors.*2003;17:1–12.
3. Liu H, Wang H, Shenvis S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004;1019:346–9.
4. Wang H, Liu H,Liu RM. Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. *Exp.Gerontology.* 2003;38;507–17.
5. De Leve L, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic GSH. *Sem.Liver.Dis.*1990;10:251-66.
6. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann.Rev.Biochem.* 1983;52:711-60.
7. Hogg N.The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Ann.Rev. Pharmacol.Toxicol.* 2002;42:585–600.
8. Oja SS, Janaky R, Varga V, Saranasaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem. Int.* 2000;37:299–306.
9. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellularprotagonist. *BiochemPharmacol.* 2003;66:1499–503.
10. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects.Med.* 2009;30:1–12.
11. Woodbridge JE. Glutathione reagent and test method. 1976. United States Patent: 3864085A.
12. Hissin PJ, Hilf R.A fluorometricmethodor determination of oxidized and reducedglutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976;74:214-26.
13. Agrawal SB, Agrawal M, Lee EH, Kramert GF. Changes in polyamine and glutathione contents of a green alga. *Chlorogoniumelongatum (dang) franceexposedto mercury.* *Environ.Exp.Botany.* 1992;32:145-51.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* 1959;82:70–81.
15. 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.
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.
17. Di Pietra AM, Gotti R, Bonazzi D, Andrisano V, Carvini V. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2013;12(1):91-8.
18. Giustarini D, Dally-Donne I, Milzani A, Fanty P, Rossi R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat.Protoc.* 2013;8:1660-69.
19. Lee S, Yim J, Lim K, Kim J. 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.

20. 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;36:335–45.
21. 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.
22. Yan M, G-B Shi G, Sui Y, Guo T, Zhang J-W, Fan S-J. Determination of reduced glutathione in human plasma by RP-HPLC. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*. 2008;3:251–3.
23. Safavi A, Maleki N, Farjami E, Aghakhani Mahyari F. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode. *Analytical Chemistry*. 2009;81(18):7538-43.
24. Raouf J, 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. *Journal of Applied Electrochemistry*. 2009;39(8):1169-75.
25. European Pharmacopoeia. 8th ed. – European Directorate for Quality of Medicines and Health care. Strasbourg, France;2014. 2727 p.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Алексеева Ксения Александровна – аспирант кафедры фармацевтической химии фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: 740890@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0002-0711-3505.

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

Новиков Олег Олегович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. Область научных интересов: фармацевтическая химия, фармакогнозия. E-mail: novikov@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-3145-6783.

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

Authors:

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

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

Novikov Oleg Olegovich – PhD (Pharmacy), Professor, Head of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Department, Belgorod State National Research University. Research interests: pharmaceutical chemistry, pharmacognosy. E-mail: novikov@bsu.edu.ru, ORCID: 0000-0003-3145-6783.

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

Поступила в редакцию: 02.04.2018
Отправлена на доработку: 03.06.2018
Принята к печати: 21.06.2018

Received: 02.04.2018
Sent back for revision: 03.06.2018
Accepted for publication: 21.06.2018