КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАТІОНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ ПЕРОКСИКИСЛОТНОГО ОКИСНЕННЯ

[1]Блажеєвський М.Є., [2]Мороз В.П.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

[1]Кафедра фізичної та колоїдної хімії, [2]кафедра аналітичної хімії

blazejowski@ukr.net

Глутатіон (GSH, *L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин*) є біологічно активний трипептид, який виявляють у всіх організмах. Складається із залишків γ-глутамінової кислоти, цистеїну та гліцину (рис.1). Він може перебувати в окисненій (GS-SG) та відновленій (G-SH) формі.

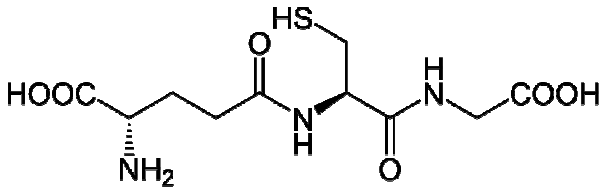

Рис. 1. Хімічна формула Глутатіону відновленого.

Відомо декілька фізіологічних функцій GSH. Відновлена форма GSH захищає SH-групи білків від окиснення різними окисниками. Механізм захисту полягає в окисненні SH-групи самого GSH з утворенням окисненої форми і збереженням SH-груп білків в активній відновленій формі. GSH виступає кофактором деяких оксидоредуктаз – гліоксилази, формальдегіддегідрогенази [1]. Важлива роль належить GSH у зв'язуванні вільних радикалів, відновленні гідроген пероксиду та інших пероксидів, що запобігає розвитку вільнорадикальних процесів. GSH бере участь у транспорті амінокислот через плазматичні мембрани ентероцитів та інших клітин (мозку, нирок) – γ-глутамілтрансферазний цикл. Шляхом кон'югації з GSH під дією ферменту GSH-трансферази знешкоджується низка ксенобіотиків, зокрема. деякі лікарські речовини, а також інактивуються деякі ендогенні метаболіти (естрадіол, простагландини, лейкотрієни) [1, 2]. Для кількісного визначення глутатіону використовують окисно-відновне титрування 0,001 моль/л (*f*=1/6, KJO_3) розчином калій йодату в присутності калій йодиду та крахмалю до синього забарвлення:

$$6\ GSH + KJO_3 + 5KJ + 6HCl = 3\ GS\text{-}SG + 6HJ + 6KCl + 3\ H_2O.$$

Еквівалент глутатиону дорівнює 6 GSH/ 6 =307,3 г/моль. 1,00 мл 0,001 моль/л (*f*=1/6, KJO_3) розчину калій йодату відповідає 0,307 мг глутатіону відновленого [2,3].

Згідно Фармакопеї Великобританії (ВР) вміст основної речовини у субстанції глутатіону відновленого знаходять методом йодиметрії. У колбі розчиняють 0,500 г досліджуваної речовини та 2 г калій йодиду R у 50 мл води R. Охолоджують розчин у крижаній воді і додають 10 мл хлоридної кислоти R1 та 20,0 мл 0,05 М розчину йоду. Залишають стояти в темряві впродовж 15 хв. Титрують 0,1 М натрій тіосульфатом, використовуючи 1 мл розчину крохмалю Р, доданого під кінець титрування, як індикатор. Окремо здійснюють титрування без аналіту. 1,00 мл 0,05 М розчину йоду еквівалентна 30,73 мг $C_{10}H_{17}N_3O_6S$. Крім того, для визначення малих кількостей глутатіону знаходить застосування низка високочутливих фізико-хімічних методів, таких, як спектрофотометрія, заснована на взаємодії глутатіону з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [4] та з реактивом Еллмана [5], а також широко

відомий спектрофлуориметричний метод заснований на взаємодії о-фталевого альдегіду з SH-групою глутатіону та ін.

Вивчення нами кінетики та стехіометрії реакції окиснення глутатіону за допомогою дипероксіадипінової кислоти (ДПАК) методом йодометричного титрування свідчать про те, що швидкість та глибина процесу *S*-оксидації головним чином визначається кислотністю середовища та співвідношенням компонентів.

На рис. 2 наведені кінетичні криві реакцій окиснення глутатіону надлишком дипероксіадипінової кислоти залежно від pH середовища. У слабкокислому середовищі глутатіон практично миттєво піддається оксидаційному сполученню з утворенням дисульфурової сполуки GS-SG, яка в подальшій реакції з надлишком ДПАК кількісно перетворюються у відповідні продукти приєднання двох, а відтак чотирьох атомів оксигену. Кількісне окиснення утворених дисульфурових похідних до відповідних їм сульфонових похідних за умови достатнього надлишку окисника досягається уже при pH 3,6 за 15 хв (рис.3).

У всіх випадках як продукт відновлення дипероксикислоти знаходили відповідну дикарбонову кислоту з кількісним виходом (ідентифікацію здійснено методом тонкошарової хроматографії та pH-потенціометричного титрування після екстракції діетиловим етером). Утворення глутатіонсульфонової кислоти (GSO_3H) як кінцевого продукту реакції окиснення глутатіону дипероксикислотою не спостерігали, що було доведено хроматографічно. Виходячи зі стехіометрії реакцій, кінцевим продуктом окиснення слід вважати дисульфон глутатіону окисненого. Глутатіонсульфонова кислота утворювалася лише в кислому середовищі в присутності каталізатора процесу калій броміду. На підставі експериментально одержаних даних була запропонована схема перетворень глутатіону за участю дипероксикислоти (Рис. 4).

Як результат дослідження нами опрацьована методика та показана можливість здійснення кількісного визначення глутатіону за реакцією окиснення дипероксикарбоновою кислотою у водному середовищі (pH 5,2) методом йодометричного титрування: до проби GSH додають відомий надлишок ДПАК при pH 5,2 (0,1 М фосфатний буфер) і витримують до завершення реакції (не більше 10 хв), потім додають надлишок калій йодиду і титрують витіснений йод 0,01-0,02 М робочим розчином натрій тіосульфату. При визначенні 3,10-6,14 мг глутатіону відновленого RSD < 0,01. LOQ = 0,01 мг.

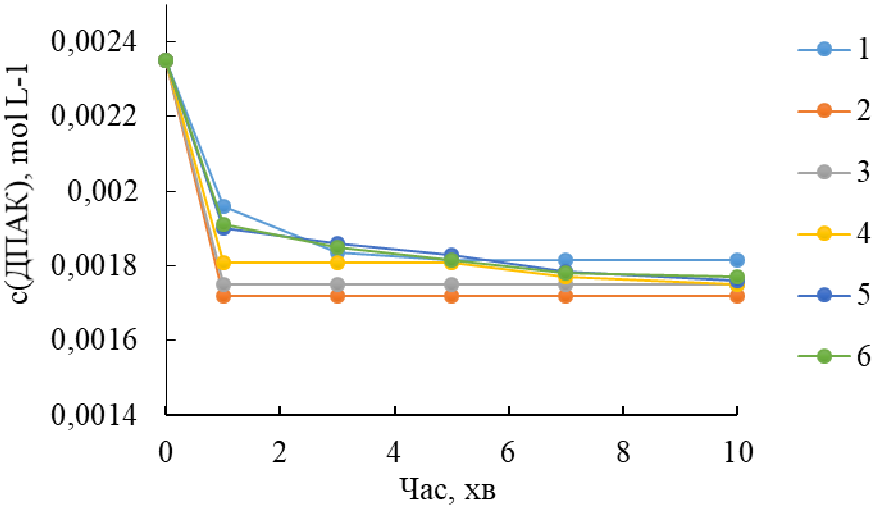

Рис. 2. Кінетичні криві окиснення глутатіону дипероксіадипіновою кислотою залежно від pH : *1*- 4,7; *2*- 5,2; *3*-6,3; *4*-7,0; *5*-7,8; *6*-8. c(GSH)=$5\cdot10^{-4}$ mol L^{-1}; c(ДПАК)=$2{,}35\cdot10^{-4}$ mol L^{-1}.

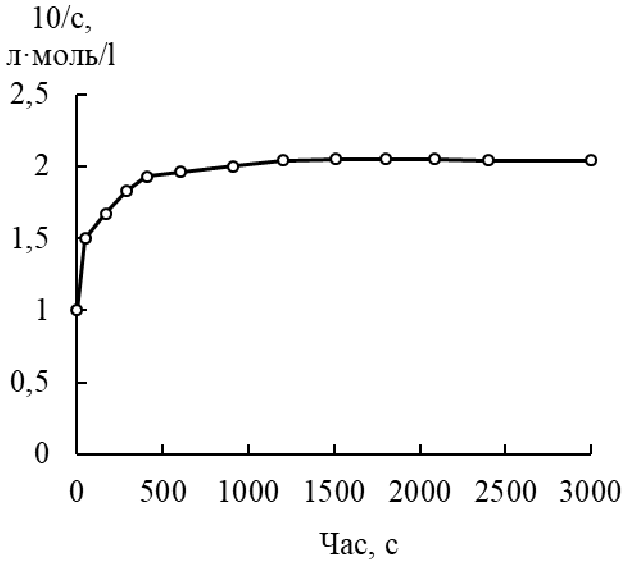

Рис. 3. Обернено-концентраційна анаморфоза кінетичної кривої окиснення глутатіону дипероксіадипіновою кислотою. c(GSH) = $1 \cdot 10^{-3}$ М; $c_{(ДПАК)}$=$3 \cdot 10^{-3}$ М. pH 3,6.

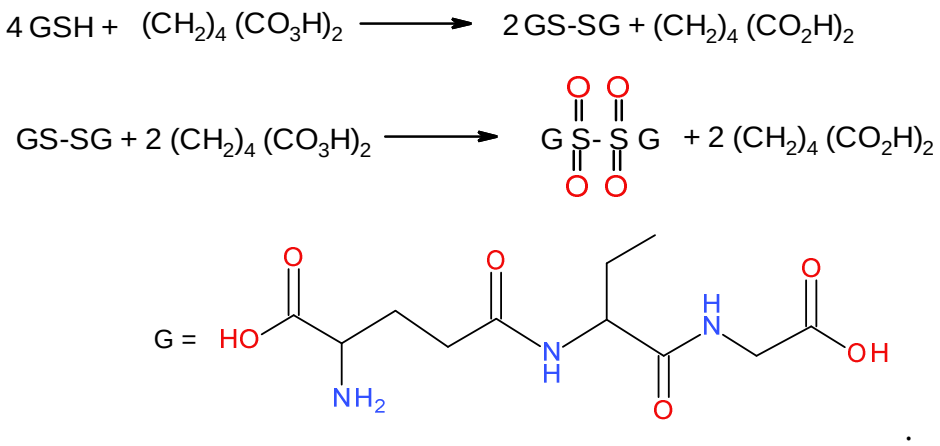

Рис. 4. Схема взаємодії глутатіону з ДПАК.

Отже, нами вперше запропоновано здійснювати кількісне визначення глутатіону за новою аналітичною реакцією, а саме пероксикислотного окиснення. Перевагами, що вигідно відрізняють опрацьовану нами методику від відомої фармакопейної, є вища чутливість, що дозволяє визначати мікрограмові кількості препарату з достовірною точністю.

Література

1. Гараева С. Н., Редкозубова Г. В., Постолати Г. В. Аминокислоты в живом организме. Кишинев: АН Молдовы, 2009. 552 с.
2. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. С. 98 – 100.
3. Чупахина Г. Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум. Калининград : Калинингр. ун-т., 2000. 59 с.
4. Woodbridge J. E. Princeton N. J. Патент США: US3864085A. Glutathione reagent and test method. 31.10.1973.
5. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959. 82 (1). 70–77. DOI: https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.