

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАТІОНУ МЕТОДОМ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ЗА ЕФЕКТОМ ІНГІБУВАННЯ РЕАКЦІЇ ОКИСНЕННЯ ЛЮМІНОЛУ ГІДРОГЕН ПЕРОКСИДОМ В ПРИСУТНОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ

Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Кафедра фізичної та колоїдної хімії

blazejowski@ukr.net

Глутатіон (GSH, *L*- γ -глутаміл-*L*-цистеїніл-гліцин) – біологічно активний трипептид, який виявляють в усіх організмах. Складається із залишків γ -глутамінової кислоти, цистеїну та гліцину. Він може перебувати як в окисненій (GS-SG), так і відновленій (G-SH) формі (рис. 1). Відновлена форма GSH захищає SH-групи білків від окиснення різними окисниками.

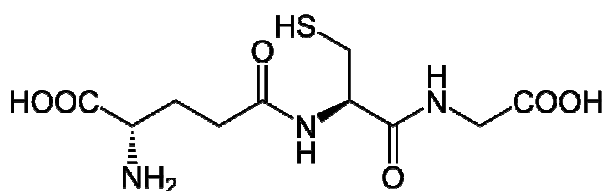


Рис. 1 Хімічна формула глутатіону відновленого

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. Важлива роль GSH полягає у зв'язуванні вільних радикалів, відновленні гідроген пероксиду та інших пероксидів, що запобігає розвитку вільнорадикальних процесів [1]

У лабораторній практиці його необхідно визначати як у біологічних рідинах (сльюна, сеча, сировотка крові), так й у фармацевтичних чи косметичних препаратах. Для цього широко використовують різноманітні інструментальні методи аналізу, такі як спектрофотометрія, заснована на взаємодії глутатіону з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензоатною кислотою чи з реактивом Еллмана [2], високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з різноманітними детекторами та передколонковою дериватизацією [3], електроаналітичні методи [4], а також кінетичний метод хемілюмінесценції [5]. Останній характеризується простотою реалізації, невисокою вартістю та можливістю мініатюризації приладної бази.

Згідно Фармакопеї Великобританії (BP) вміст основної речовини у субстанції глутатіону відновленого знаходять методом йодиметрії.

Метою дослідження було з'ясування можливості здійснення кількісного визначення глутатіону відновленого у ліофілізованому порошку для виготовлення розчину для внутрішньовенного та внутрішньом'язового уведення «Глютіон» за ефектом інгібування хемілюмінесценції системи люмінол (H_2L) – H_2O_2 – гемоглобін (Hb).

Об'єктом дослідження були субстанція глутатіону відновленого та ліофілізований порошок для виготовлення розчину внутрішньовенного та внутрішньом'язового уведення «Глютіон» по 0.6 г № 10 виробництва «Laboratorio Farm. ST srl» (Італія).

Визначення вмісту глутатіону в порошку здійснювали методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування люмінолової реакції з використанням Hb як каталізатора процесу.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на установці – хемілюмінометрі «ХЛ 01» з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0,5 та швидкодіючим потенціометром-самописцем.

Найвища інтенсивність хемілюмінесценції у системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ спостерігалась, коли останнім додається розчин Hb . Оптимальні умови: $c(NaOH) = 0,05$ моль·л⁻¹, $c(H_2O_2) = 8,53 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹, $c(H_2L) = 5 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹, $C(Hb) = 5 \cdot 10^{-2}$ мкг·мл⁻¹.

Наявність глутатіону у системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ призводить до зменшення максимальної інтенсивності та суми хемілюмінесценції (S), що свідчить про інгібування хемілюмінесцентної реакції. Цей ефект зростає зі збільшенням концентрації інгібітора процесу. Лінійна залежність S (у відн. од.) від молярної концентрації глутатіону зберігалась в інтервалі концентрацій $2 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹ (рис. 2).

Рівняння графіка мало вигляд $S = (-1,6 \pm 0,2) \cdot 10^7 c + (198,9 \pm 2,0)$, ($R = 0,999$), де c – концентрація розчину глутатіону в $mol \cdot L^{-1}$. $LOD = 1,5 \cdot 10^{-7}$ моль·л⁻¹; $LOQ = 4,4 \cdot 10^{-7}$ моль·л⁻¹.

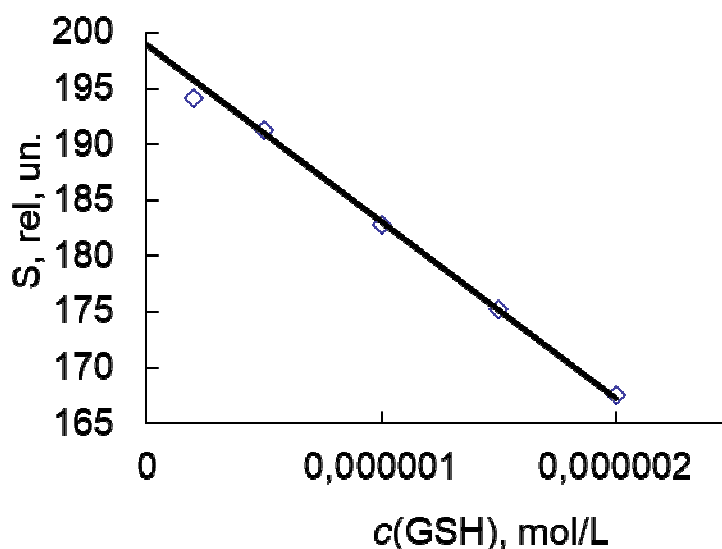


Рис. Залежність S (у відн. од.) від молярної концентрації глутатіону

Висновки. Опрацьована методика та показана можливість кількісного визначення глутатіону у ліофілізованому порошку «Глютіон» по 0,6 г методом інгібування хемілюмінесценції системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$. $RSD = \pm 3,4$ %.

Література

1. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор). *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012. №2–2(84). С. 178–180
2. 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](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
3. Дутов А. А., Никитин Д. А., Фефелова Е. В., Мищенко М. Н., Семенова А. Н., Сверкунова А. В., Мартынова А. В., Лукьянова Ю. Л., Ермолина А. В. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. 2014. N 7. С.29-32.
4. Perevezentseva D. O., Gorchakov É. V. Voltammetric Determination of Glutathione Using Graphite Electrodes Modified with Gold Nanoparticles. *Industrial laboratory. Diagnostics of materials*. 2015;81(7):24-27. (In Russ.).
5. Chaichi M. J, Ehsani M., Khajvand T., Golchoubian H., Rezaee E. Determination of cysteine and glutathione based on the inhibition of the dinuclear Cu(II)-catalyzed luminol- H_2O_2 chemiluminescence reaction. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Mar 25;122:405-10. doi: 10.1016/j.saa.2013.10.105.