

ФАРМАЦИЯ

УДК 615.074

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ТАУРИНА, КАРНОЗИНА И ГЛУТАТИОНА

М.А. Халикова¹
Д.А. Фадеева¹
А.А. Зинченко²
Е.Т. Жилыкова¹
О.О. Новиков¹

¹⁾ *Белгородский государственный университет*

²⁾ *Украинский фармакопейный центр качества лекарственных средств*

e-mail: khalikova@bsu.edu.ru

В статье изложены результаты, полученные в ходе разработки высокоэффективной жидкостной хроматографии-методики разделения смеси и идентификации соединений аминокислотной природы. Приведена подробная методика получения ДНФ-производных исследуемых веществ, условия их хроматографирования. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанной методики для разделения смеси и идентификации таурина, карнозина и глутатиона.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, таурин, карнозин, глутатион восстановленный, идентификация, разделение.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), интенсивно развиваясь несколько последних десятилетий, зарекомендовала себя в качестве одного из самых универсальных методов разделения и фармакопейного анализа субстанций и лекарственных средств [1].

Метод ВЭЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие биологически активные вещества неустойчивы при высоких температурах [2].

Целью настоящей работы явилась разработка ВЭЖХ-методики разделения смеси таурина, карнозина и глутатиона восстановленного.

Из всех вариантов ВЭЖХ, обращенно-фазовый применяется в настоящее время наиболее широко. Его привлекательность определяется методической простотой и универсальностью, во многих случаях – простотой механизма сорбции и предсказуемостью поведения веществ на основании их строения [3].

Объектами исследования послужили стандартные образцы таурина, карнозина и глутатиона восстановленного, являющиеся веществами аминокислотной природы.

Основными проблемами при анализе аминокислот и пептидов являются большие различия в их полярности, так как боковые группы некоторых из них заряжены в широком диапазоне значений рН, а так же низкие коэффициенты поглощения света в УФ-области [4]. Во избежание этих трудностей проводят пред- или послеколоночную дериватизацию, получая производные, пригодные для спектрофотометрического детектирования, более гидрофобные, чем исходные соединения. Однако, послеколоноч-

ная дериватизация неудобна тем, что требует дополнительного нестандартного оборудования, вызывающего искажение хроматографических пиков.

Учитывая вышеизложенное, нами выбран оптимальный способ обращенно-фазовой ВЭЖХ с градиентным элюированием и предколоночной дериватизацией компонентов смеси 1-фтор-2,4-динитробензолом (ДНФ).

Пробоподготовка и ход анализа. Получение ДНФ-производных стандартных образцов (СО) компонентов смеси проводили следующим образом.

Около 0,1 г (точная навеска) СО таурина, 0,1 г (точная навеска) СО карнозина и 0,125 г СО глутатиона восстановленного помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 40 мл 0,05 М раствора натрия тетрабората, перемешивали до полного растворения веществ, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали. 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл 0,05 М раствора натрия тетрабората, 2,0 мл 10 % раствора 1-фтор-2,4-динитробензола в диоксане, выдерживали в течение 40 мин при температуре 40 °С, затем охлаждали в темном месте до комнатной температуры. Объем полученного раствора доводили до метки 50%-ным метанолом, перемешивали и фильтровали через фторопластовый фильтр с размером пор не более 0,5 мкм.

Смесь ДНФ-производных исследуемых компонентов получали аналогичным способом.

Условия хроматографирования. Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе LC – 20 AD, Shimadzu (Япония) методом обращено-фазной ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C18-AQ 150? 4 мм, с зернистостью сорбента 5 мкм в режиме термостатирования при 40°С. Полное время проведения анализа – 30 минут.

Градиентное элюирование осуществляется смешиванием двух элюентов:

- подвижная фаза «А» – 8,5% раствор метанола в фосфатном буферном растворе (доведенная до рН 2,0 кислотой ортофосфорной);
- подвижная фаза «В» – 85% раствор метанола в фосфатном буферном растворе (доведенная до рН 2,0 кислотой ортофосфорной).

Программа градиента представлена на рис. 1.

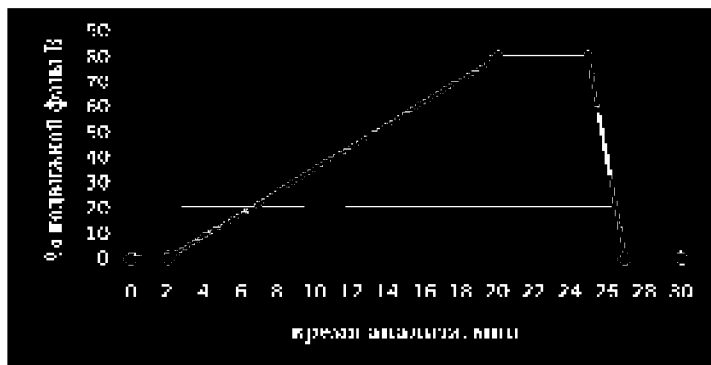


Рис. 1. Программа градиента по подвижной фазе «В»

Объем вводимой пробы – 5 мкл, скорость потока подвижной фазы 0,75 мл/мин. УФ-детектирование осуществляли при длине волны 375 нм (вольфрамовая лампа).

Хроматографирование проводили не менее 3 раз, по мере выполнения требований к пригодности хроматографической системы.

Идентификацию веществ проводили путем сравнения времени удерживания пиков, то есть время удерживания пиков ДНФ-производных таурина, карнозина и глутатиона в исследуемой смеси должны совпадать со временем удерживания пиков на хроматограмме ДНФ-производных стандартных образцов таурина, карнозина и глутатиона.

Результаты исследования. В результате эксперимента были получены хроматограммы 1-фтор-2,4-динитробензола, ДНФ-производных СО карнозина, таурина, глутатиона восстановленного и их смеси (рис. 2).

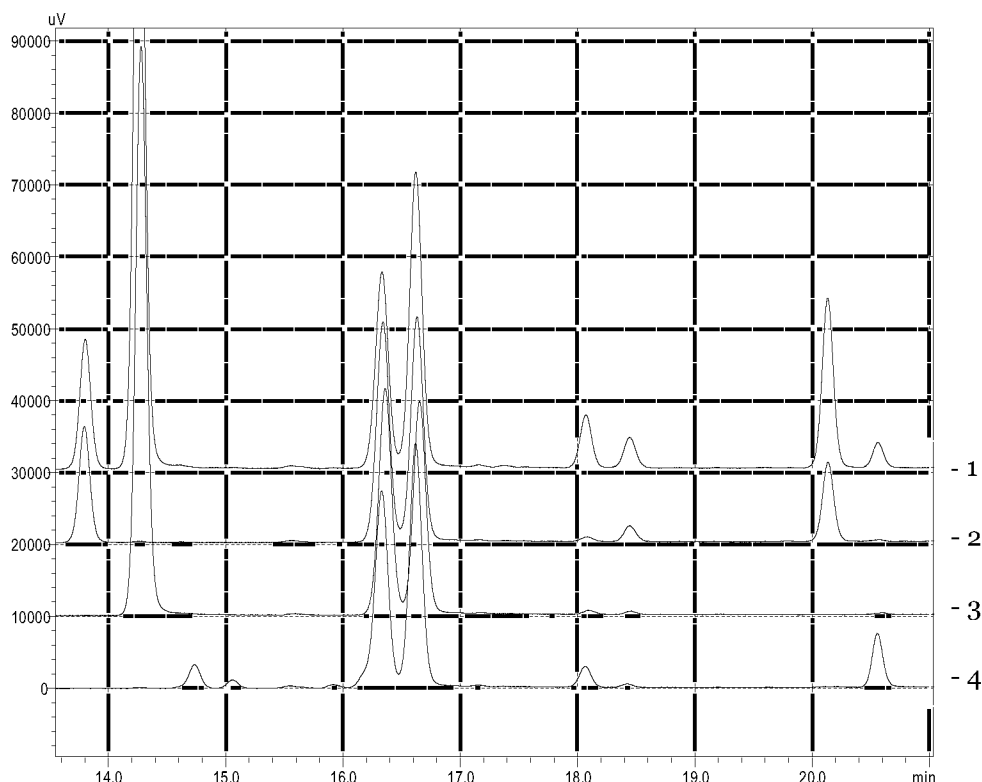


Рис. 2. Хроматограммы исследуемых образцов. 1 – хроматограмма смеси исследуемых компонентов; 2 – хроматограмма ДНФ-производного карнозина; 3 – хроматограмма ДНФ-производного таурина; 4 – хроматограмма ДНФ-производного глутатиона восстановленного

Для реагента – 1-фтор-2,4-динитробензола – при данных условиях хроматографирования характерно наличие двух пиков со временами удерживания 16,3 и 16,6 минут. На хроматограммах дериватов таурина, карнозина и глутатиона также наблюдаются аналогичные пики избытка реагента.

При дериватизации карнозина образуются два производных со временами удерживания 13,8 мин. и 20,1 мин. Время удерживания ДНФ-производного таурина составило 14,3 мин. ДНФ-производному глутатиона восстановленного соответствует пик со временем удерживания 20,5 мин.

На полученных хроматограммах пики производных СО карнозина, таурина и глутатиона совпадают с таковыми на хроматограмме исследуемой смеси. В связи с чем, можно сделать вывод о пригодности разработанной методики для разделения смеси исследуемых компонентов и их идентификации.

Таким образом, разработанная методика является воспроизводимой и может быть рекомендована для качественного анализа и дальнейшей разработки количественного определения таурина, карнозина и глутатиона при их совместном присутствии в различных лекарственных формах.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., Государственный контракт № П217 от 23 апреля 2010 г.

Литература

1. Барам, Г.И. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармакопейном анализе / Г.И. Барам, Д.В. Рейхарт, Е.Д. Гольдберг, Б.Н. Изотов, М.О. Родинко, В.А. Хазанов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т.135. – №1. – С. 75-79.



2. Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа: метод. пособие для спец. курса / Е.Н. Шаповалова, А.В. Пирогов ; под общ. ред. Е.Н. Шаповаловой. – М.: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007. – 109 с.

3. Буланова, А. В. Хроматография в медицине и биологии: учебное пособие / А.В. Буланова, Ю.Л. Полякова; Федер. агенство по образованию. – 2-е изд. – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006. – 116 с.

4. Бойченко, А. П. Алифатические карбоновые кислоты как новые модификаторы для разделения 2,4-динитрофенильных производных аминокислот методом мицеллярной жидкостной хроматографии / А.П. Бойченко, А. Ю. Куликов, Л. П. Логинова // Вестник Харьковского национального университета. Серия: Химия. – 2006. – №731. – Вып. 14(37). – С. 101-111.

APPLICATION OF THE METHOD OF REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TO SEPARATE MIXTURES AND IDENTIFICATION OF TAURINE, CARNOSINE AND GLUTATHIONE

M.A. Khalikova¹

D.A. Fadeeva¹

A.A. Zinchenko²

E.T. Zhilyakova¹

O.O. Novikov¹

¹Belgorod State University

*²Ukrainian Center
Pharmacopoeian quality of drugs,
Kharkov*

e-mail: khalikova@bsu.edu.ru

The article presents the results of HPLC separation method to identify compounds and mixtures of amino acids nature. Provides a detailed procedure for obtaining DNP-derivatives of the substances and the conditions of chromatography. The results indicate the suitability of the developed method for separating mixtures and identification of taurine, carnosine and glutathione.

Key words: HPLC, taurine, carnosine, glutathione, identification, separation.