

УДК 543.545.618.346-008.8

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Е.В. Нарезжная^{1}, И.И. Крукиер², В.В. Авруцкая²,
А.С. Дегтярева², Е.А. Игумнова¹*

¹Южный федеральный университет,
Ростов-на-Дону, 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Зорге, 7; тел.: 8(863)2975152;
эл. почта: evn@sfedu.ru

²Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии
Росмедтехнологий, Ростов-на-Дону

Разработаны условия определения глутаминовой кислоты без предварительной дериватизации методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Изучено влияние pH и концентрации буферного электролита на результаты определения глутаминовой кислоты. Показано, что оптимальными при постоянном напряжении (15 кВ) являются концентрация боратного буфера 5 мМ и pH 9,15. Количественное определение глутаминовой кислоты проведено методом внешнего стандарта с использованием линейной зависимости между концентрацией аналита и площадью хроматографического пика. Правильность и воспроизводимость результатов определения подтверждена методом “введено-найдено”. Проведён анализ образцов экстракта плаценты 16 женщин. Процедура определения не превышает 30 мин. Результаты показали значительное снижение уровня глутаминовой кислоты при осложненной плацентарной недостаточностью беременности по сравнению с физиологической, что позволяет рассматривать её содержание в качестве возможного маркера осложненного течения беременности.

Ключевые слова: глутаминовая кислота, капиллярный зонный электрофорез, беременность, плацента

DOI: 10.18097/PBMC20156105628

ВВЕДЕНИЕ

Свободные аминокислоты имеют большое функциональное значение для многих метаболических процессов в организме человека и выполняют функцию биорегуляторов. При этом глутаминовая кислота (Glu) играет ключевую роль в многочисленных клеточных процессах, поскольку потребность в них организма намного выше потребности в остальных аминокислотах. Глутаминовая кислота считается естественным “топливом” для головного мозга, улучшает умственные способности, способствует ускорению лечения язв, повышает сопротивляемость усталости. В настоящее время известно её значение в комплексе метаболических процессов, играющих определённую роль в физиологии плода. Быстрорастущий плод зависит от достаточного поступления глутаминовой кислоты для обеспечения роста и нормальных физиологических функций организма плода [1-15].

Для профилактики и лечения форм гестационной патологии, важнейшее значение имеет ранняя диагностика на всех этапах беременности [16-20]. Продукты большинства биохимических реакций являются строительным материалом для всех макромолекул, в том числе составляющих основу генома и транскриптома (нуклеотиды), протеома (аминокислоты) [21]. Исследования глутаматного обмена между кровью матери, плацентой и плодом могут привести к улучшению понимания процессов, ответственных за развитие преждевременных родов. С этих позиций, важной и, несомненно, актуальной задачей современного химико-фармацевтического анализа является разработка точных и доступных методов количественного определения глутаминовой кислоты в биологических жидкостях.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Работа основана на результатах исследования 16 беременных женщин в возрасте 18-36 лет, находившихся под наблюдением в клинических подразделениях Ростовского НИИ акушерства и педиатрии. При проведении исследования соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Все обследуемые получили полную информацию о проводимом исследовании и подписали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования.

Реактивы и стандарты

Для приготовления растворов в работе использовали бидистиллированную воду. Исходные растворы глутаминовой кислоты готовили растворением точной навески химически чистого стандарта (Sigma®, ReagentPlus™) в бидистиллированной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением исходного раствора непосредственно перед использованием. Для приготовления буферного раствора использовали тетраборат натрия (ч.д.а.), нужное значение pH устанавливали добавлением раствора гидроксида натрия и борной кислоты.

Аппаратура и оборудование

Электрофоретическое определение проводили при использовании системы капиллярного электрофореза “Капель-105” с переменной полярностью, УФ-детектором и пневматическим вводом пробы (НПФ АП “Люмэкс”, Россия). Для проведения анализа использовался немодифицированный кварцевый капилляр с внешней полиамидной плёнкой общей (эффективной) длиной 60 (50) см и внутренним диаметром 75 мкм. Время ввода пробы составляло 15 с при давлении 30 мбар (450 мбар·с). Рабочее напряжение составляло +15 кВ. Для отведения Джоулева тепла использовалась жидкостная система термостатирования капилляров. Сбор и обработку данных проводили с помощью IBM PC с программным обеспечением “Мультихром” (АО “Амперсэнд”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Растворы глутаминовой кислоты имеют значительное поглощение в интервале длин волн 200–210 нм. Поэтому мы использовали детектирование при длине волны 200 нм. С учётом констант диссоциации глутаминовой кислоты ($pK_1=2,16$; $pK_2=4,32$; $pK_3=9,96$) [22] были подобраны условия определения. В качестве наиболее подходящего был выбран боратный буфер, так как он может использоваться в широком диапазоне концентраций без существенного увеличения тока, что позволяет применять высокие напряжения в ходе анализа. Значение изоэлектрической точки $pI=3,24$ говорит о том, что в боратном буфере глутаминовая кислота существует в анионной форме.

Известно, что некоторые аминокислоты можно определять в среде 20 мМ боратного буфера при pH 9,15 [23-24]. Проведенные исследования показали принципиальную возможность определения глутаминовой кислоты в этих условиях. Однако следует отметить, что время выхода глутаминовой кислоты достаточно велико и составляло 24-26 мин. При этом увеличение времени миграции пика увеличивает и его площадь, так как площадь пика пропорциональна времени миграции: поздно мигрирующие компоненты перемещаются через зону детектирования медленнее. Ширина пиков у основания составляла около двух мин.

На время миграции и величину площади хроматографических пиков в капиллярном зонном электрофорезе могут оказать влияние pH и концентрация буфера. Показано, что во всём изученном интервале pH 8,2–10,2 эта зависимость невелика и не вносит заметных коррективов в результаты анализа. Влияние же концентрации ведущего электролита более значимо. Электроотрицательный поток (ЭОП) увеличивается по мере уменьшения концентрации буфера и поэтому в малых концентрациях подходит для анализа отрицательно заряженных, мигрирующих против ЭОП, проб глутаминовой кислоты. Установлено, что при постоянном напряжении (15 кВ) и концентрации буфера 5 мМ аминокислота может быть обнаружена в течение 15 мин.

Адсорбция органической составляющей пробы на стенках капилляра может отрицательно сказываться на разделении, поскольку приводит к ухудшению воспроизводимости времен миграции, уширению и асимметрии пиков, и даже к необратимой адсорбции компонентов пробы. При работе с немодифицированным капилляром необходимо после каждого проведенного разделения при вводе пробы из биологических матриц основательно промыть капилляр (2 мин – дистиллированной водой, 2 мин раствором NaOH, 2 мин дистиллированной водой и 3 мин – рабочим буфером). При этой операции молекулы, адсорбированные на стенках капилляра, удаляются, и воспроизводимость системы улучшается.

Количественное определение глутаминовой кислоты проводили методом внешнего стандарта с использованием линейной зависимости между концентрацией аналита и площадью хроматографического пика. Для определяемых веществ были получены уравнения калибровочной зависимости методом линейного регрессионного анализа: $Y = 0,000858x$, $R^2 = 0,9999$, где Y – площадь пика; x – концентрация аминокислоты, г/л; R^2 – коэффициент корреляции.

Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 0,010-1 г/л ($C_{min,p}=0,008$ г/л, $S_r=0,05$). Эффективность капилляра высока, так как число теоретических тарелок (N) составляет 30 тысяч. Правильность и воспроизводимость результатов определения подтверждена методом “введено-найденно”. Введено 50,0 мг/л Glu, найдено $50 \pm 1,2$ мг/л, $S_r=0,02$ ($n=8$; $t_{0,95}=2,37$; $n=7$; $t_{0,95}=2,45$).

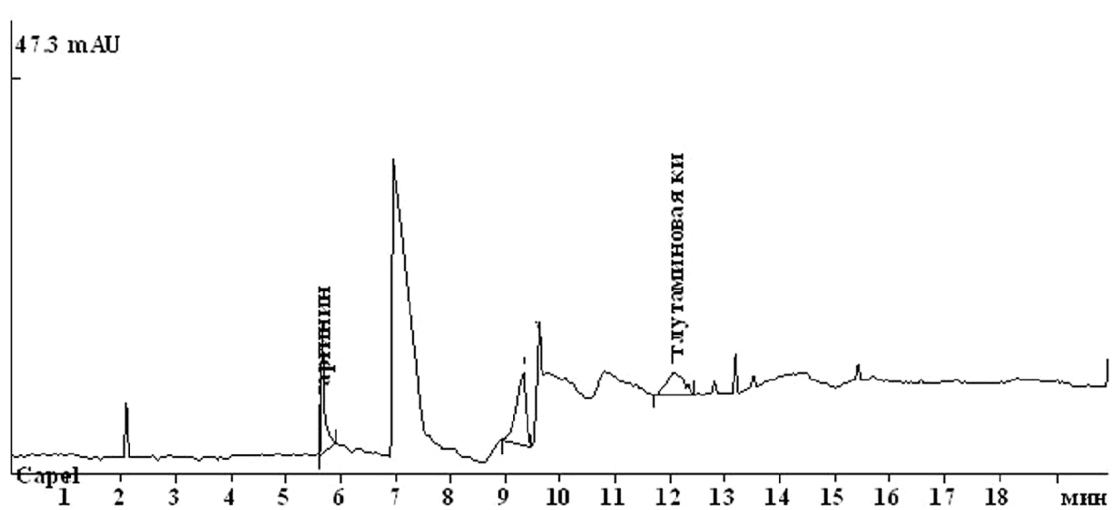


Рисунок. Электрофореграмма определения глутаминовой кислоты в гомогенате плаценты.

На основе проведенной статистической обработки полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что определение глутаминовой кислоты методом капиллярного зонного электрофореза обладает достаточной надёжностью и точностью.

Разработанная методика была применена для анализа экстракта плаценты, взятой у женщин при доношенной физиологической беременности и беременности, осложнённой плацентарной недостаточностью (рисунок). До начала исследования образцы хранили в течение 1-25 суток при температуре -85°C . Непосредственно перед анализом подготовку пробы экстракта проводили обработкой 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты с целью депротенинизации с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 550 g.

Результаты свидетельствуют о значительном снижении уровня глутаминовой кислоты при осложнённой плацентарной недостаточностью беременности (27 ± 3 мкг/г) по сравнению с физиологической (42 ± 4 мкг/г), что позволяет рассматривать её содержание в качестве возможного маркера осложненного течения беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемая методика определения глутаминовой кислоты без предварительной дериватизации методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) характеризуется правильностью результатов, простотой, экспрессностью и отвечает требованиям, предъявляемым к современным методам мониторинга биообъектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. (2008) Биология, в 3 томах: учебник. Мир, М.
2. Раевский К.С., Георгиев В.П. (1986) Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрехимические аспекты. Медицина, М., 240 с.
3. Heй Дж. (2001) J. Nutr., **131**(Supplement), 2585-2589.
4. Lighthart-Melis G.C., Van De Poll M.C.G., Boelens P.G., Dejong C.H.C., Deutz N.E.P., Van Leeuwen P.A.M. (2008) Am. J. Clin. Nutr., **87**, 1282-1289.
5. Curi R., Lagranha C.J., Doi S.Q. et al. (2005) J. Cell. Physiol., **204**, 392-401.
6. Neu J., DeMarco V., Li N. (2002) Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, **5**, 69-75.
7. Wischmeyer P.E. (2007) Critical Care Medicine, **35**, S541-S544.
8. Ziegler T.R., Ogden L.G., Singleton K.D. et al. (2005) Intensive Care Medicine, **31**, 1079-1086.
9. Kadrofske M.M., Parimi P.S., Gruca L.L., Kalhan S.C. (2006) Am. J. Physiol., **290**, E622-E630.
10. Battaglia F.C., Regnault T.R.H. (2001) Placenta, **22**, 145-161.
11. Thompson S.W., McClure B.G., Tubman T.R.J. (2003) J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., **37**, 550-553.
12. Li Z.H., Wang D.H., Dong M. (2007) Chinese Medical Journal, **120**, 140-144.
13. Poindexter B.B., Ehrenkranz R.A., Stoll B.J. et al. (2003) Am. J. Clin. Nutr., **77**, 737-743.
14. Wang Y., Tao Y.X., Cai W., Tang Q.Y., Feng Y., Wu J. (2010) Clinical Nutrition, **29**, 307-311.
15. Haberle J., Gorg B., Toutain A. et al. (2006) J. Inher. Metab. Dis., **29**, 352-358.
16. Хлыбова С.В., Циркин В.И. (2008) Медицинский альманах, **5**, 68-71.
17. Орлов В.И., Погорелова Т.Н., Крукиер И.И., Сагамонова К.Ю., Друккер Н.А. (2009) Околоплодные воды. Химический состав и физиологические функции. Эверест, Ростов н/Д.
18. Погорелова Т.Н., Гулько В.О., Линде В.А. (2014) Биомед. химия, **60**, 596-601.
19. Grillo M.A., Lanza A., Colombatto S. (2008) J. Amino Acids, **34**, 517-523.
20. Tapiero H., Mathé G., Couvreur P., Tew K.D. (2002) Biomedicine and pharmacotherapy, **56**, 446-457.
21. Трифонова О.П., Лохов П.Г., Арчаков А.И. (2014) Биомед. химия, **60**, 281-293.
22. Якубке Х.-Д. (1985) Аминокислоты, пептиды, белки (пер. с нем. Запаваловой Н.П. и Максимовой Е.Е.), Мир, М., 457 с.

23. *Нарежная Е.В., Аскалепова О.И., Крукиер И.И., Погорелова Т.Н., Никашина А.А.* (2011). *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, №1, 48-50.
24. *Нарежная Е.В., Аскалепова О.И., Никашина А.А., Крукиер И.И., Погорелова Т.Н.* (2010) *Журнал аналитической химии*, **65**, 1309-1312.

Поступила: 19. 01. 2015.

**DETERMINATION OF GLUTAMIC ACID IN BIOLOGICAL MATERIAL
BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

E. Narezhnaya¹, I. Krukier², V. Avrutskaya², A. Degtyareva², E.A. Igumnova¹

¹Southern federal university,

7 Zorge str., Rostov-on-Don, 344090 Russia; tel.: 8(863)2975152; e-mail: evn@sfnedu.ru

²Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov-on-Don, Russia

The conditions for the identification and determination of Glutamic acid by capillary zone electrophoresis without their preliminary derivatization have been optimized. The effect of concentration of buffer electrolyte and pH on determination of Glutamic acid has been investigated. It is shown that the 5 Mm borate buffer concentration and a pH 9.15 are optimal. Quantitative determination of glutamic acid has been carried out using a linear dependence between the concentration of the analyte and the area of the peak. The accuracy and reproducibility of the determination are confirmed by the method "introduced - found". Glutamic acid has been determined in the placenta homogenate. The duration of analysis doesn't exceed 30 minutes. The results showed a decrease in the level of glutamic acid in cases of pregnancy complicated by placental insufficiency compared with the physiological, and this fact allows to consider the level of glutamic acid as a possible marker of complicated pregnancy.

Key words: Glutamic acid, capillary electrophoresis, pregnancy, placenta