



УДК 543.544

ВЭЖХ анализ аскорбиновой кислоты в биологических жидкостях и некоторых пищевых продуктах

Дутов А.А., Никитин Д.А., Ахметшина А.М., Ахметшина О.М.,
Мартынова А.В., Сверкунова А.В., Ермолина А.В., Федорова Е.Н.,
Коновалова О.Н., Лукьянова Ю.Л., Мищенко М.Н., Семенова А.Н.

ГБОУ ВПО Читинская медицинская академия, Чита
ФГБОУ ВПО Забайкальский государственный университет, Чита

Поступила в редакцию 3.09.2012 г.

Аннотация

Предложен ВЭЖХ метод определения общей аскорбиновой кислоты в плазме крови, слюне, слезной жидкости и некоторых пищевых продуктах. Биологические образцы депротеинизировали и очищали с помощью ацетонитрила и хлороформа. Аскорбиновую кислоту окисляли в дегидроаскорбиновую с помощью раствора йода. Последующую дериватизацию проводили с помощью *o*-фенилендиамина при умеренных условиях (15 мин, 40°C). Дериваты разделяли обращенно-фазной (С18) ВЭЖХ с УФ 365 нм и флюориметрической ex365-em412 нм детекцией. Элюент содержал 20% ацетонитрила и 0.05% трифторуксусной кислоты. Полное разделение достигалось менее чем за 2 мин при скорости потока 1400 мкл/мин. Простота, воспроизводимость и высокая чувствительность метода, позволяют использовать его в клинической практике для оценки биохимических изменений при глазных и стоматологических заболеваниях, а также для измерения концентрации аскорбиновой кислоты в ягодах, фруктах и соках.

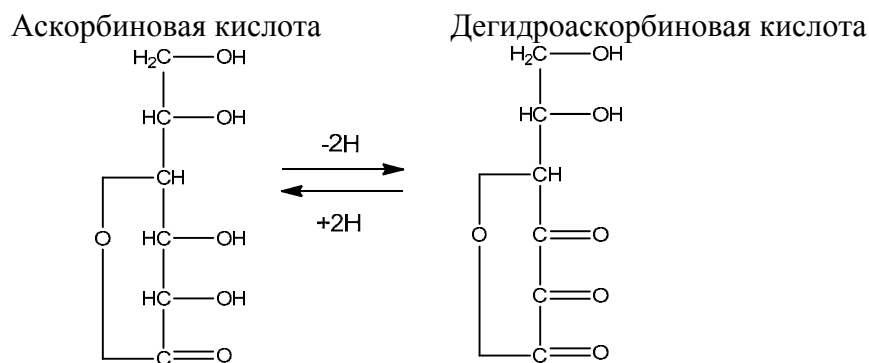
Ключевые слова: ВЭЖХ, УФ и флюориметрическая детекция, аскорбиновая кислота, плазма, слюна, слезная жидкость, пищевые продукты.

An HPLC method for measuring total ascorbic acid in human plasma, saliva, plaintive liquid (or tear) and some foodstuff was validated. Biological samples were deproteinized and cleared using acetonitrile and chloroform. Ascorbic acid oxidized in dehydroascorbic acid by means of iodine solution. The further derivatization was carried out *o*-phenylenediamine under the mild conditions (15 min, 40°C). The derivatives were separated by reversed phase (C18) HPLC with UV 365 nm and fluorimetric detection at ex365-em418 nm. We are used high-speed columns (100 × 4.6 mm) Chromolith Performance RP-18e from Merck. The mobile phase consisted of 20 % acetonitrile and 0.05 % trifluoroacetic acids. Full separation was reached less than for 2 minutes at speed of a flow of 1400 µl/min. Simplicity, reproducibility and high sensitivity of a method, allow its use in a clinical practice for an estimation of biochemical changes at eye and stomatologic diseases and also for measurements of concentration of an ascorbic acid in berries, fruit and juices.

Keywords: HPLC, UV and fluorimetric detection, ascorbic acid, plasma, saliva, plaintive liquid (tear), foodstuff

Введение

Аскорбиновая кислота – лактон кислоты близкой по структуре к глюкозе. Существует в двух формах: восстановленной (reduced, аскорбиновая кислота, АК) и окисленной (oxidized, дегидроаскорбиновая кислота, ДАК).



Обе формы аскорбиновой кислоты быстро и обратимо переходят друг в друга и в качестве коферментов участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и обе обладают биологической активностью [1]. Аскорбиновая кислота может окисляться кислородом воздуха, пероксидом и другими окислителями. ДАК легко восстанавливается в АК цистеином, глутатионом, сероводородом, дитиозеритритолом, меркаптоэтанолом, т.е. веществами, содержащими сульфгидрильные группы [2]. Сумма АК + ДАК образует общую (total) АК [2]. Поддержание концентрации аскорбиновой кислоты в крови в диапазоне 4.87–11.75 мг/л [2] обеспечивает нормальное протекание многих биохимических реакций в организме.

ВЭЖХ анализ АК в биологическом материале чаще проводят с использованием электрохимической или УФ детекции [2–5] и реже флуориметрической [6]. Разработаны методы определения АК в овощах и фруктах [7, 8], а также соках цитрусовых [9]. Большинство методов сложны, продолжительны, требуют дорогостоящих реагентов и аппаратуры, а потому мало подходят для клинической и лабораторной практики. В качестве альтернативы, мы предлагаем простой и чувствительный метод определения общей АК в биологических жидкостях на основе модификации известного метода [6], адаптации его к анализу АК в слюне и слезной жидкости, а также некоторых пищевых продуктах.

Эксперимент

Стандарты и реактивы. Свежеприготовленный стандарт аскорбиновой кислоты (Fluka) готовили на 2% водной H_3PO_4 (Fluka) в концентрации 100 мкг/мл. Йод металлический (ОСЧ, "Реахим"): 0,254 мг/мл в йодиде калия 0,249 мг/мл (ХЧ, "Реахим"). Сохраняется до 1 месяца при $+4^{\circ}C$ в посуде из темного стекла. Ацетатный буфер 0,1 М: 0,2 М CH_3COOH (ХЧ, "Реахим") получали разбавлением ледяной уксусной кислоты водой до концентрации 11,5 мкл/мл + 0,2 М $CH_3COONa \times 3 H_2O$ (ХЧ, "Реахим"), 27,22 мг/мл. Смешивали 0,2 М CH_3COOH и 0,2 М CH_3COONa (63:37, v/v, pH 4.4) и разбавляли водой 1:1 (v/v). Сохраняется до 1 месяца при комнатной температуре. Свежеприготовленный раствор *o*-фенилендиамина дигидрохлорида (Sigma): 1.33 мг/мл в 0,1 М ацетатном буфере. Ацетонитрил и изопропанол (HPLC-grade, Panreac), хлороформ (Merck), трифторуксусная кислота (TFA, 99%, Panreac).

Аппаратура и оборудование. Флуориметрический детектор RF-10AXL (Shimadzu, Япония), спектрофотометрический детектор Shimadzu SPD-M20, насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Япония), ручной инжектор 7725i

Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа "Мультихром" версия 3.0 (Амперсанд, Москва). Колонки: Chromolith Performance RP-18e 100 × 4.6 мм с монолитным сорбентом, около 3000 ТТ¹ и защитной предколонкой 5 × 4.6 мм (Merck, Германия); Synergi Hydro-RP 150 × 4.6 мм, 4 мкм (Phenomenex, США), около 9500 ТТ с предколоночными фильтрами 0.5 мкм (Supelco, США). Флюориметрическая детекция ex365-em418 нм, чувствительность минимальная (Sens=1, Gain=2). УФ детекция при 266 и 365 нм. Вортекс Intelli-Mixer RM-1L, центрифуги CM-6M и CM-50 (Elmi, Латвия).

Биологический материал. Кровь забирали в гепаринизированные пробирки (vacutainer), центрифугировали 10 мин при 2000 rpm и отбирали 1 мл плазмы в 2-мл полипропиленовые пробирки с овальным дном. Слюну собирали в 1.5-мл полипропиленовые пробирки и замораживали при -20⁰С. Перед исследованием слюну оттаивали и центрифугировали 2 мин при 10.000 rpm (CM-50, Elmi, Латвия). Слезную жидкость в количестве 10-20 мкл отбирали нетравматичным аспиратором собственного изготовления с одноразовыми наконечниками и замораживали при -20⁰С.

АК относительно стабильна в биопробах и стандартах с добавлением фосфорной кислоты (50 г/л) при 4⁰С [2]. Если плазму консервировать дитиотрейтолом при нейтральном рН, то тогда АК сохраняется в течение 6 лет при -70⁰С. Возможен и такой вариант: 300 мкл плазмы смешивали с равным объемом свежеприготовленной метафосфорной кислоты (10% wt/vol²), перемешивали и хранили при -70⁰С, а стандарт чистой АК (0.5 – 5 мкг/мл) готовили на свежеприготовленной метафосфорной кислоте (2.5% wt/vol) [10].

Обсуждение результатов

Депротеинизация и экстракция. К 1 мл плазмы или слюны добавляют 1 мл ацетонитрила, интенсивно перемешивают на вортексе (режим F8), центрифугируют 2 мин при 10000 rpm. Затем отбирают 1 мл супернатанта в 4.5 мл полипропиленовые пробирки с закручивающей крышкой (BD Diagnostic), прибавляют 3.5 мл хлороформа, перемешивают на вортексе (режим F1), центрифугируют 2 мин при 3000 rpm и отбирают 200 мкл верхней водной фазы. Слезную жидкость из-за ограниченного объема и отсутствия в ней белка, сразу подвергали дериватизации. Обычный объем – 20 мкл, а количество реагентов пропорционально уменьшали. Стандарт АК обрабатывали аналогично: к 1 мл воды добавляли 50 мкл стандарта (1000 нг/мкл), а далее обрабатывали как биопробу, отбирая в финале 200 мкл для дериватизации (=10.000 нг АК).

В основе метод [11], предложенный для анализа высокополярных β-лактамных антибиотиков в плазме. При этом неполярные и умеренно полярные соединения остаются в ацетонитриле – хлороформе, а высокополярные в верхней водной фазе. Такой подход позволяет получить чистые экстракты высокополярных веществ и, кроме того, отсутствует разбавление первоначального образца.

ВЭЖХ нативной АК. Нативные формы α-кетокислот (АК и ДАК) определять с помощью УФ детекции проблематично. Если АК более или менее детектируется при 266 нм, то ДАК не имеет стабильного поглощения в УФ диапазоне. Кроме того,

¹ Мы заведомо использовали "старую" колонку со сниженной эффективностью, отработавшую 1.5 года; первоначально заявленная эффективность фирмой-производителем – более 8500 ТТ.

² Weight/volume, т.е. вес/объем

высокая полярность обеих кислот вынуждает использовать элюенты без органического компонента и, как следствие, специализированных колонок (Synergi Hydro-RP или Polar-RP). Ниже приведены хроматограммы стандарта АК и экстракта свежей плазмы (рис. 1).

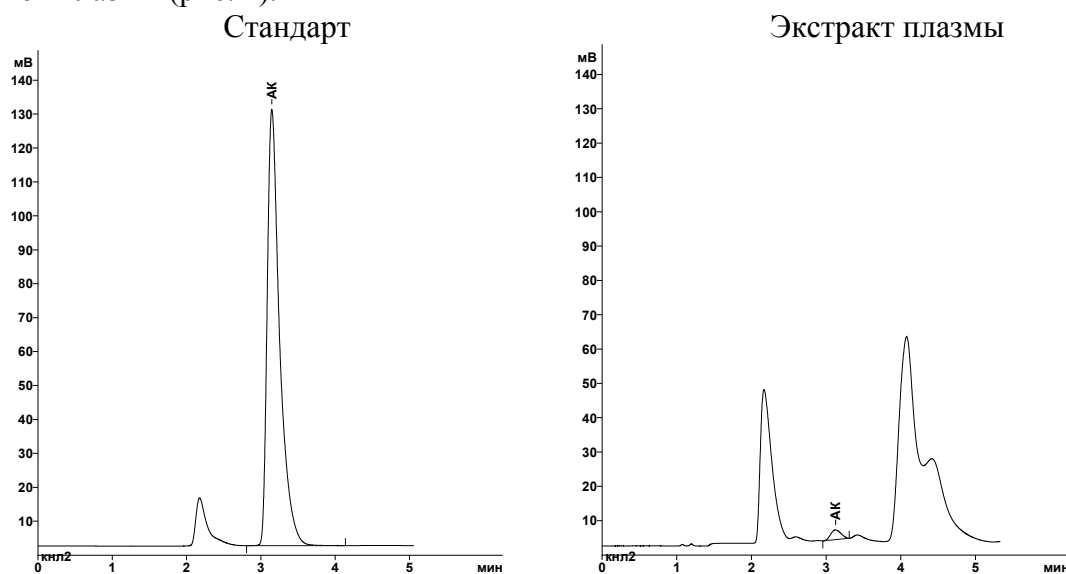


Рис. 1. Хроматограммы стандарта АК (1000 нг) и экстракта плазмы (10 мкл = 0.01 мл). Колонка Synergi Hydro-RP 150 × 4.6 мм, 4 мкм, УФ 266 нм, 0.5% изопропанола + 0.05% TFA, 700/мин, 54 бара.

В данном случае стандарт и биопроба проведены через процедуру жидкостной экстракции/очистки без дериватизации. Выход в пределах 93 – 98% ($n=33$). Чувствительность низкая, экстракты достаточно чистые. Метод вряд ли можно рекомендовать для практического применения, однако, его можно использовать для проверки стандартов и оценки экстракции.

Дериватизация. К 200 мкл водной фазы добавляют 200 мкл 1 мМ йода в 1.5 мМ йодиде калия, выдерживают 10 секунд при комнатной температуре, добавляют 200 мкл раствора *o*-фенилендиамина в 0.1 М ацетатном буфере и инкубируют в термостате 15 мин при 40°C в темноте (рис. 2). 20 мкл полученного раствора вводят в хроматографическую систему.

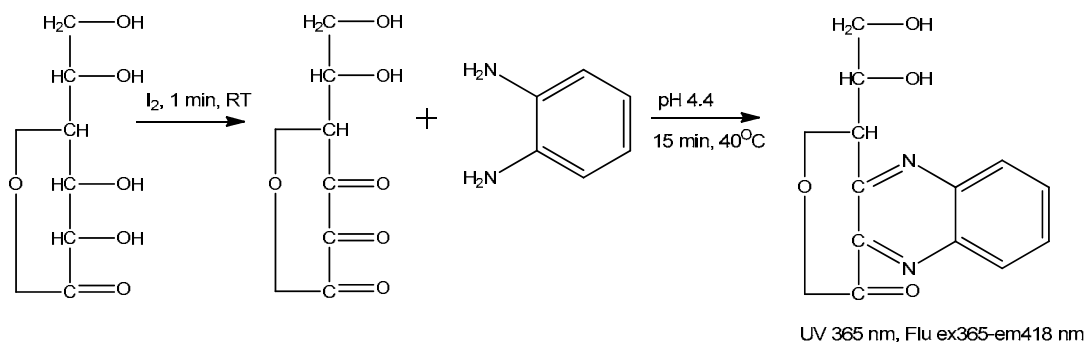


Рис. 2. Этапы химической модификации аскорбиновой кислоты: превращение в дегидроаскорбиновую с помощью йода и дериватизационная реакция с *o*-фенилендиаминном.

В процессе работы были оптимизированы условия дериватизационной реакции: продолжительность и температурный режим. Для этого провели обычную

процедуру дериватизации с проверенным стандартом АК, в петлю вводили эквивалент 100 нг деривата АК. Оценку производили по высоте пика (h , mV). Разделение на Chromolith Performance RP-18e, УФ детекция при 365 нм. Результаты в таблице:

Таблица 1. Оптимизация параметров дериватизационной реакции

		h , mV
Температура (экспозиция 15 мин)	40 ⁰ С	34
	60 ⁰ С	23
	80 ⁰ С	3
Экспозиция (температура 40 ⁰ С)	15 мин	34
	30 мин	34
	45 мин	31
	60 мин	35

Таким образом, для эффективной дериватизации достаточно 15 мин при 40⁰С. Избыток йода можно нейтрализовать 10 мкл 50 мМ раствора натрия тиосульфата [6], однако, особой необходимости в этом нет. Дериваты АК (квиноксалинолы или хиноксалинолы) стабильны и достаточно летучи, что делает возможным их анализ не только с помощью ВЭЖХ, но и газовой хроматографии [12]. В реакцию с *o*-фенилендиамином вступает ДАК, но не АК. Потому перед дериватизацией АК окисляют в ДАК ферментом аскорбат оксидазой, дихлориндофенолом [13], раствором йода в йодиде калия [6]. Вместо *o*-фенилендиамина можно использовать 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) или 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene (DDB) [1, 12]. Чувствительность выше в сравнение с *o*-фенилендиамином, однако, эти реагенты менее доступны из-за высокой цены.

Типичные хроматограммы стандартов и экстрактов плазмы на рис. 3 и 4.

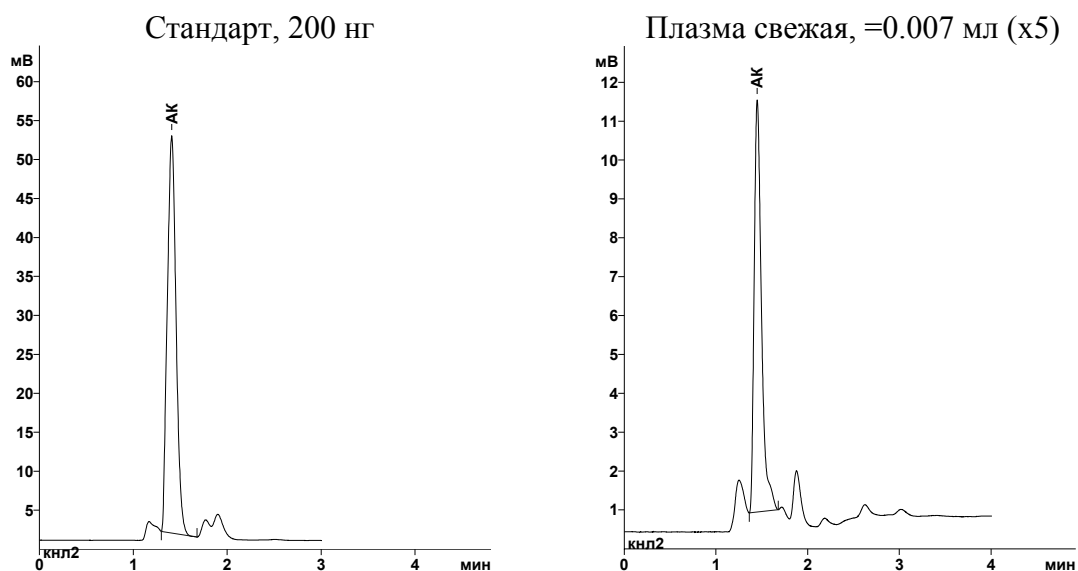


Рис. 3. Хроматограммы стандарта и экстракта биопробы. Колонка Chromolith Performance RP-18e (New) 100 × 4.6 мм, УФ детекция при 365 нм, элюент 20% водный ацетонитрил с 0.05% TFA, 1400/мин, 28 бар. Масштаб при записи экстрактов биопробы в 5 раз выше

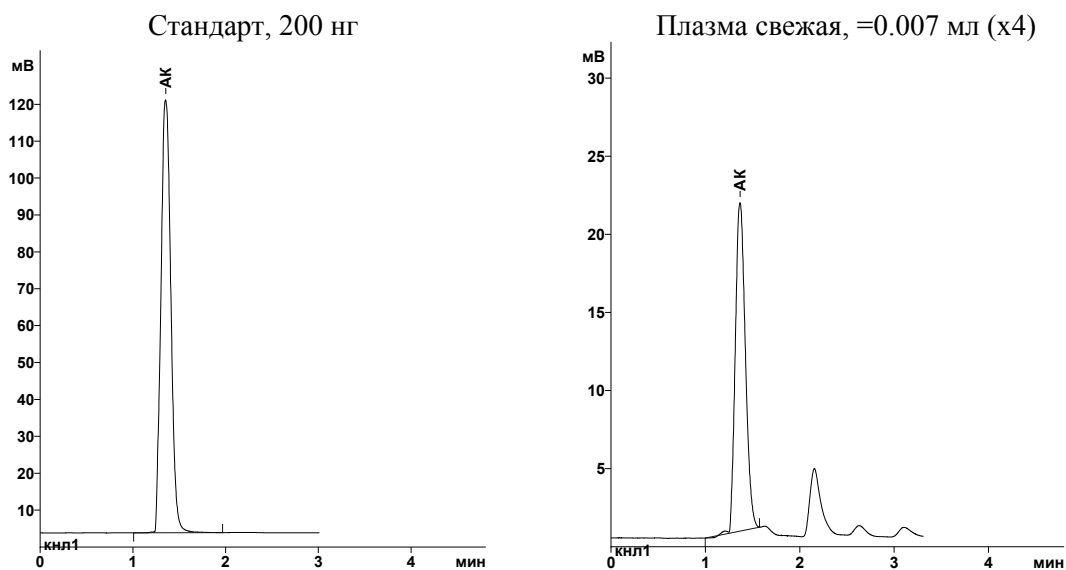


Рис. 4. Хроматограммы стандарта и экстракта той же биопробы, что на рис. 3. Колонка Chromolith Performance RP-18e (New) 100 × 4.6 мм, флуориметрическая детекция ex365-em418, чувствительность минимальная (Sens=1, Gain=3), элюент 20% водный ацетонитрил с 0.05% TFA, 1400/мин, 28 бар. Масштаб при записи экстрактов биопробы в 4 раза выше.

Таким образом, анализ дериватов АК возможен с использованием как УФ, так и флуориметрической детекции. Последняя предпочтительней, поскольку более селективна и чувствительна, а хроматографический анализ возможен на минимальной чувствительности детектора. Однако чистоту экстрактов в полной мере можно оценить только с помощью УФ детекции. Хроматограммы экстрактов слюны и слезной жидкости, выглядят почти так же, как экстракт плазмы (рис. 5).

Концентрации АК в разных биологических жидкостях отличаются (предварительные данные): в плазме 5 ± 3.1 мкг/мл ($n=33$, референтные пределы 4.87–11.75 мг/л [2]), в слюне 1.1 ± 0.8 мкг/мл ($n=12$), в слезной жидкости 10.1 ± 4.4 мкг/мл ($n=7$). Референтные пределы для двух последних еще предстоит уточнить. Отметим, что анализ АК в биологических жидкостях производился в зимнее время.

На следующем этапе исследовали содержание АК в плодово-ягодной продукции и соках. Гомогенизировали фрукты и ягоды в ступке, отбирали сок, фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) и центрифугировали (10.000 грм). Отбирали по 1 мл сока и далее обрабатывали как плазму или слюну. После дериватизации в петлю вводили 5 – 20 мкл. Результаты в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Концентрация аскорбиновой кислоты в плодово-ягодных культурах

Название	Концентрация АК, мкг/мл
1	2
Яблоки Фуши	26
Яблоки Малина	24
Яблоки Медовик	19
Яблоки Краснодар	85
Яблоки Италия	26
Апельсин	388
Вишня	17
Ежевика	6

1	2
Облепиха	475
Смородина	596
Клюква	226

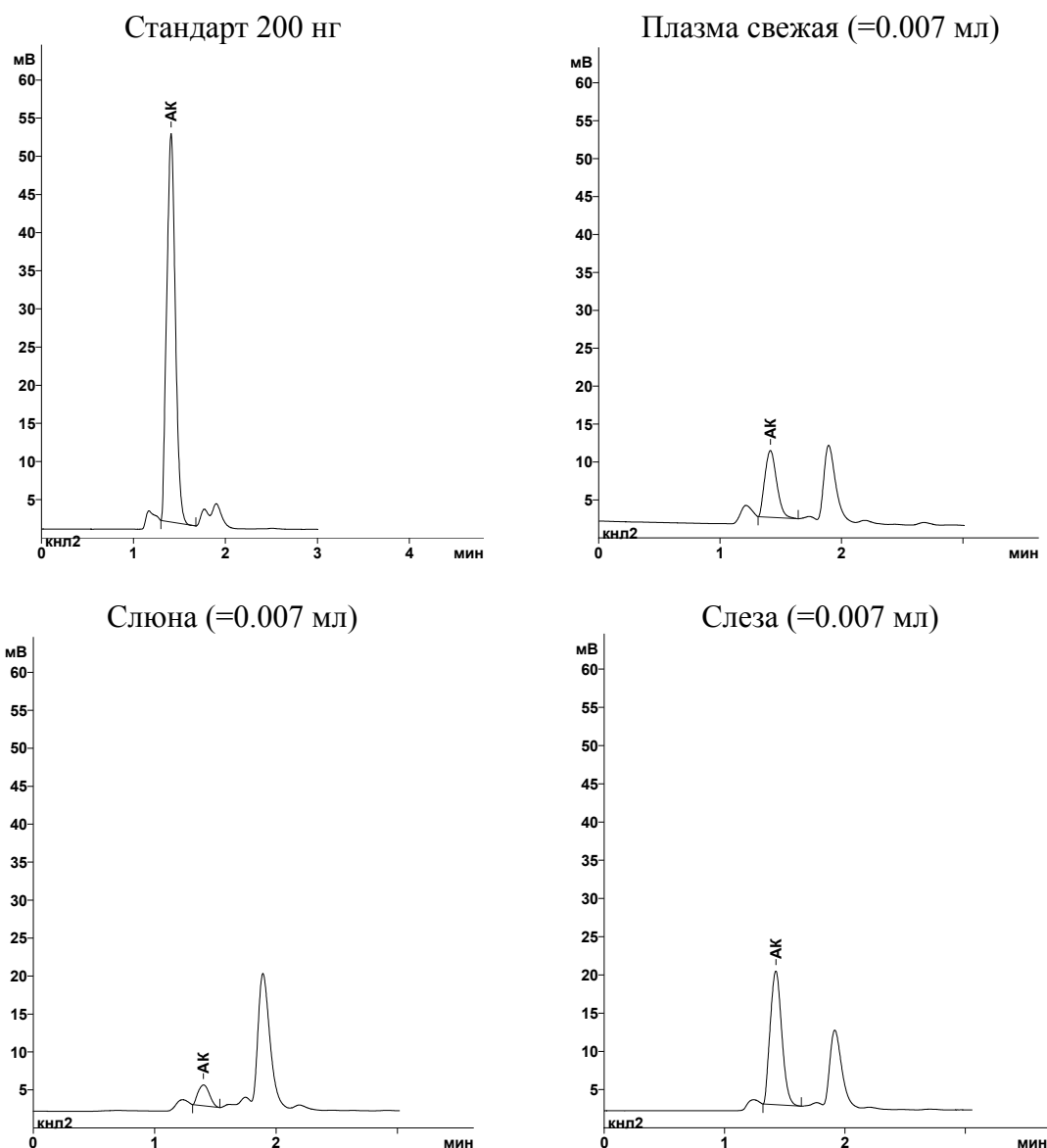


Рис. 5. Колонка Chromolith Performance RP-18e (New) 100 × 4.6 мм, УФ детекция при 365 нм, 20% водный ацетонитрил с 0.05% TFA, 1400/мин, 28 бар.

Таблица 3. Концентрация аскорбиновой кислоты в плодах киви и разных сортах апельсинового сока

Название	Концентрация АК, мкг/мл
Киви	265
Сок свежесжатый	290
Сок Добрый	141
Сок J7	114
Сок 100% Gold	135
Сок Моя семья	181
Сок Любимый	132

Необходимости в дополнительной очистке и концентрировании не было, с учетом высокой чистоты дериватов и достаточной концентрации АК в исследованных пробах.

Список литературы

1. Toshimasa Toyooka. Modern Derivatization Methods for Separation Sciences // John Wiley & Sons Ltd. – 1999. – 312 p.
2. Margolis S. Ascorbic and Dehydroascorbic Acids Measured in Plasma Preserved with Dithiothreitol or Metaphosphoric Acid // *Clinical Chemistry*. – 1990. – V. 36(10). – P. 1750-1755.
3. Kimoto E., Terada S., Yamaguchi T. Analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and transformation products by ion-pairing high-performance liquid chromatography with multiwavelength ultraviolet and electrochemical detection. // *Methods Enzymol*. 1997. 279: P. 3-12
4. Li X., Franke A.A. Fast HPLC-ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid. // *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009. V. 877(10). P. 853-856.
5. Khan M.I., Iqbal Z. Simultaneous determination of ascorbic acid, aminothiols, and methionine in biological matrices using ion-pairing RP-HPLC coupled with electrochemical detector. // *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011. V. 879(25). P. 2567-2575.
6. Iwata T. Determination of total ascorbic acid in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr. A*. 1985. – P. 351-355.
7. Spínola V., Mendes B., Câmara J.S., Castilho P.C. An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage. // *Anal. Bioanal. Chem*. 2012. V. 403(4). P. 1049-1058.
8. Gökmen V., Kahraman N., Demir N., Acar J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 881(1-2). P. 309-316.
9. Martí N., Mena P., Cánovas J.A., Micol V., Saura D. Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. // *Nat. Prod. Commun*. 2009. V. 4(5). P. 677-700.
10. VanderJagt M.S.; Philip J. Garry, Bhagavan Hemmige N. Ascorbic acid intake and plasma levels in healthy elderly people. // *J. Clin. Nutr*. 1987. V. 46. P. 290-294.
11. Jehl F., Gallion C., Monteil H. High-performance liquid chromatography of antibiotics (review). // *J. Chromatogr. - Biomed. Appl*. 1990. V. 96. P. 509-548.
12. George Lynn and Louise C. Hellwig. Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons. Inc. 1998.
13. Moeslinger T., Brunner M., Voif I. Spieckermann P. Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid. // *Clin. Chem*. 1995. V. 41(8). P. 1177-1181.
14. Margolis Sam A. and Duewer David L. Measurement of ascorbic acid in human plasma and serum: stability, intralaboratory repeatability, and interlaboratory reproducibility. // *Clinical Chemistry*, 1996. V. 42(8). P. 1257-1262.

Дутов Алексей Александрович - д.м.н.
(клиническая фармакология), врач высшей

Dutov Alexei A - MD (clinical pharmacology),
physician of the highest qualifying category

квалификационной категории (клиническая лабораторная диагностика), с.н.с. лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии научно-исследовательского института медицинской экологии при Медицинской Академии, Чита.

Никитин Денис Александрович - заведующий лабораторией химического анализа Забайкальского государственного университета, Чита

Ахметшина Анна Мунирзяновна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Ахметшина Ольга Мунирзяновна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Мартынова Анастасия Владимировна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Сверкунова Анна Викторовна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Ермолина Алена Владимировна - врач офтальмолог Краевой больницы № 2

Федорова Екатерина Николаевна - аспирант кафедры химии 3-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Коновалова Ольга Николаевна, аспирант кафедры химии 3-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Лукьянова Юлия Львовна - врач-ординатор кафедры неврологии Читинской Медицинской Академии

Мищенко Мария Николаевна - к.м.н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии Читинской Медицинской Академии

Семенова Анастасия Николаевна - аспирант кафедры хирургической стоматологии 3-го года обучения Читинской Медицинской Академии

(clinical laboratory diagnostics), Senior Research Fellow Laboratory of Experimental and Clinical Biochemistry and Immunology, Research Institute of Medical Ecology of the Medical Academy, Chita. e-mail: dutovaa@yandex.ru

Nikitin Denis A - head of the laboratory of chemical analysis of the Zabaikalsky State University, Chita, e-mail: nikitind@gmail.com

Akhmetshina Anna M. - post-graduate student Department of Chemistry 1th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Akhmetshina Olga M. - post-graduate student Department of Chemistry 1th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Martynova Anastasia V - post-graduate student Department of Chemistry 1th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Sverkunova Anna V. - post-graduate student of chemistry 1th-year learning the Zabaikalsky State University, Chita

Yermolina Alena V - physician ophthalmologist Regional Hospital № 2, Chita

Fedorova Ekaterina N – post-graduate student Department of Chemistry, 3th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Konovalova Olga N. - post-graduate student Department of Chemistry, 3th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Lukyanova Julia L - a physician ordinator Department of Neurology, Medical Academy, Chita

Mishchenko Maria N - cand. sci. med., assistant Department of Dentistry, Medical Academy, Chita

Semenova Anastasia N - post-graduate student Surgical Dentistry 3th year of study Medical Academy, Chita