

УДК 543.621, 543.641

DOI: 10.21685/2307-9150-2016-4-7

П. А. Полубояринов, И. Я. Моисеева, Н. Н. Глебова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ И АМИНОКИСЛОТЫ СЕЛЕНОЦИСТИНА С ВОССТАНОВЛЕННЫМ ГЛУТАТИОНОМ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Аннотация.

Актуальность и цели. Селен – необходимый микроэлемент в организме животных и человека. Наиболее оптимальной формой для коррекции селенодефицита является аминокислота – селеноцистин. Целью работы является изучение продуктов реакции между аминокислотой селеноцистином, селенитом натрия и восстановленным глутатионом методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Материалы и методы. Ход реакций между селенитом натрия, селеноцистином и восстановленным глутатионом (реактивы) при различных значениях pH контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО ЭкоНова).

Результаты. В работе методом ВЭЖХ изучены продукты реакции селенита натрия с восстановленным глутатионом в различных молярных соотношениях и при разных значениях pH. Выявлено образование промежуточного продукта реакции – селенодисульфида глутатиона и получен спектр его поглощения в остановленном потоке. Селеноцистин взаимодействует с восстановленным глутатионом и образует селеноцистеин-глутатиона селеносульфид, а не гидроселенид-анион, что подтверждает данные о ее ферментативном метаболизме в биологических средах.

Выводы. Аминокислота селеноцистин, взаимодействуя с восстановленным глутатионом, образует только промежуточный продукт – селеноцистеин-глутатиона селеносульфид в отличие от селенита натрия, который восстанавливается до гидроселенид-аниона.

Ключевые слова: селенит натрия, восстановленный глутатион, селенодисульфид глутатиона, гидроселенид-анион, селеноцистин, ВЭЖХ.

P. A. Poluboyarinov, I. Ya. Moiseeva, N. N. Glebova

DETERMINATION OF INTERACTION PRODUCTS OF SELENITE SODIUM AND AMINO ACID SELENOCYSTINE WITH REDUCED GLUTATHIONE BY HPLC METHOD

Abstract.

Background. Selenium is a necessary microelement in organisms of animals and humans. Selenocystine is an amino acid being the most optimal form for selenium deficiency correction. The purpose of the work is to study reaction products between

amino acid selenocystine or sodium selenite and reduced glutathione by HPLC method.

Materials and methods. The course of reactions between sodium selenite or selenocystine and reduced glutathione at various pH values was controlled by HPLC method a “Milichrom A-02” chromatograph (CJSC EkoNova).

Results. The paper describes reaction products of sodium selenite and reduced glutathione in various molar ratios and at pH values studied by HPLC method. The formation of a reaction intermediate product – glutathione selenium disulfide – has been revealed and its absorption spectrum in stopped flow has been obtained. Selenocystine interacts with reduced glutathione and forms selenocysteine-glutathione selenium sulfide, instead of hydroselenide-anion, that confirms the data about its enzymatic metabolism in biological media.

Conclusions. Selenocystine amino acid interacting with reduced glutathione forms only an intermediate product – selenocysteine-glutathione selenium sulfide – unlike sodium selenite, which is reduced to hydroselenide-anion.

Key words: sodium selenite, selenocystine, reduced glutathione, glutathione selenium disulfide, hydroselenide-anion, selenocysteine-glutathione selenium sulfide, HPLC.

Селен – один из эссенциальных микроэлементов в организме животных и человека. Согласно современным представлениям общей регулируемой формой селена в организме является селенид(гидроселенид)-анион [1]. Неорганические соединения селена – оксид селена (SeO_2), селенит натрия (Na_2SeO_3) – вступают в неферментативную реакцию с восстановленным глутатионом (GSH) с образованием селенидглутатиона (GS-Se-SG) [2, 3]:



Согласно общей схеме окислительно-восстановительной реакции при избытке GSH селенидглутатион (GSSeSG) легко восстанавливается с образованием селеноперсульфида (GSSeH), селеноводорода. Селеноводород окисляется до элементного селена[4]:



Неорганические соединения селена давно и широко используют для коррекции селенодефицита в питании человека и рационах животных. Самым главным недостатком селеновых добавок на основе селенита натрия является то, что их поведение в организме трудно регулируемо: высокое содержание восстановленного глутатиона и других тиолов в биологических системах (около 5 ммоль/л) способствует восстановлению селенит-ионов до высокотоксичного селеноводорода [5].

Наиболее перспективной формой селеноорганических соединений, применяемых для коррекции селенодефицита, является аминокислота селеноцистеин (окисленная форма – селеноцистин), которая поступает в организм животных и человека по аминокислотной транспортной системе и метаболизируется только ферментативно. На кафедре «Физика и химия» Пензенского государственного университета архитектуры и строительства был разработан и проведен синтез селенсодержащей аминокислоты L-селеноцистина (окисленная форма аминокислоты селеноцистеина), получен патент № 2537166 (РФ).

Целью работы является изучение продуктов реакции между аминокислотой селеноцистином, селенитом натрия и восстановленным глутатионом методом ВЭЖХ.

Реактивы и методы

В работе были использованы реактивы: глутатион восстановленный, селенит натрия, элементный селен, боргидрид натрия (ЗАО Вектон), селеноцистин, полученный по патенту № 2537166 (РФ). Дисульфид глутатиона получали барботированием воздухом раствора восстановленного глутатиона при $\text{pH} = 8$ в течение нескольких часов.

Для подтверждения идентичности гидроселенид-аниона/селеноводорода элементный селен восстанавливали боргидридом натрия. Для этого к 4,5 мг элементного селена добавили 4,5 мг боргидрида натрия, растворенных в 5 мл 0,1 н. буры, и перемешивали в течение получаса, используя гидрозатвор для предотвращения окисления образовавшегося гидроселенид-аниона, и затем подавали в хроматограф. Отмечали форму пика и объем удерживания в стандартных условиях.

При синтезе селеноводорода из элементного селена и боргидрида натрия в растворе буры образуется в основном гидроселенид-анион – HSe^- [6], однако при хроматографировании используется раствор, содержащий хлорную кислоту с $\text{pH} = 2$ [7], и в данных условиях в основном будет присутствовать недиссоциированный селеноводород (H_2Se).

Для идентификации селенодисульфида глутатиона, который получают взаимодействием раствора селенита натрия и восстановленного глутатиона, использовалась методика, предложенная в работе [8].

Хроматографирование проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО ЭкоНова). Хроматографическая колонка размером 2,0×75 мм заполнена сорбентом ProntoSil-120-5C18AQ, зерно 5,0 мкм. Элюирование осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила 2–90 % (по объему). Подвижная фаза «А»: 0,2М LiClO_4 и 0,005М HClO_4 (ЗАО ЭкоНова), подвижная фаза «Б»: ацетонитрил (НПК Криохром).

Результаты и обсуждение

В работе [8] показана возможность хроматографического анализа продуктов взаимодействия оксида селена (SeO_2) с восстановленным глутатионом методом ВЭЖХ при различных значениях pH и соотношениях исходных веществ.

В настоящей работе были проведены хроматографические исследования взаимодействия селенита натрия (Na_2SeO_3) с GSH при молярном соотношении 1:1 и разных значениях pH для определения продуктов реакций. На рис. 1–4 представлены хроматограммы продуктов взаимодействия реакционных смесей селенита натрия и GSH в кислой ($\text{pH} = 2,8; 4,0$), нейтральной ($\text{pH} = 7$) и щелочной ($\text{pH} = 9$) средах.

На хроматограмме (см. рис. 1) присутствуют четыре основных пика, которые принадлежат гидроселенид-аниону/селеноводороду (I), восстановленному глутатиону (II) и окисленному глутатиону (III) соответственно, так как их объемы удерживания совпадают с объемами удерживания веществ-стандартов. Объем удерживания и порядок выхода пика селенодиглутатиона (IV) совпадал с данными работы [8].

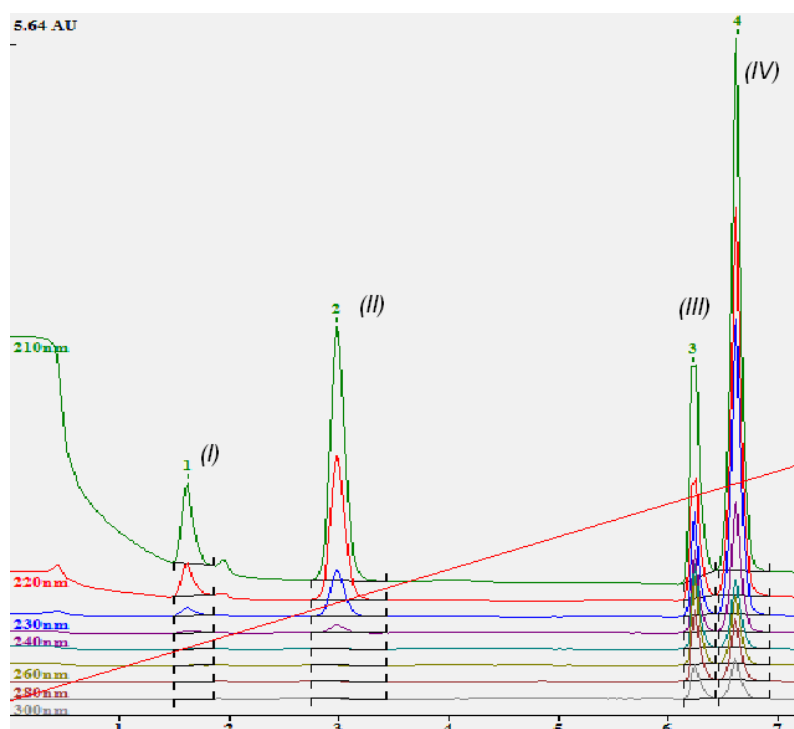


Рис. 1. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селенита натрия и восстановленного глутатиона (pH = 2,8)

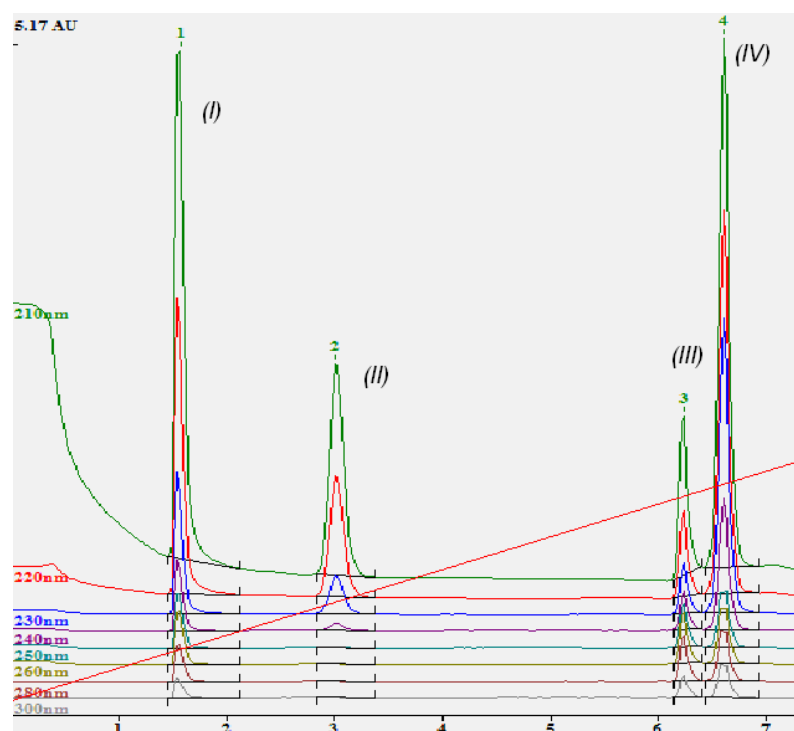


Рис. 2. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селенита натрия и восстановленного глутатиона (pH = 4,0)

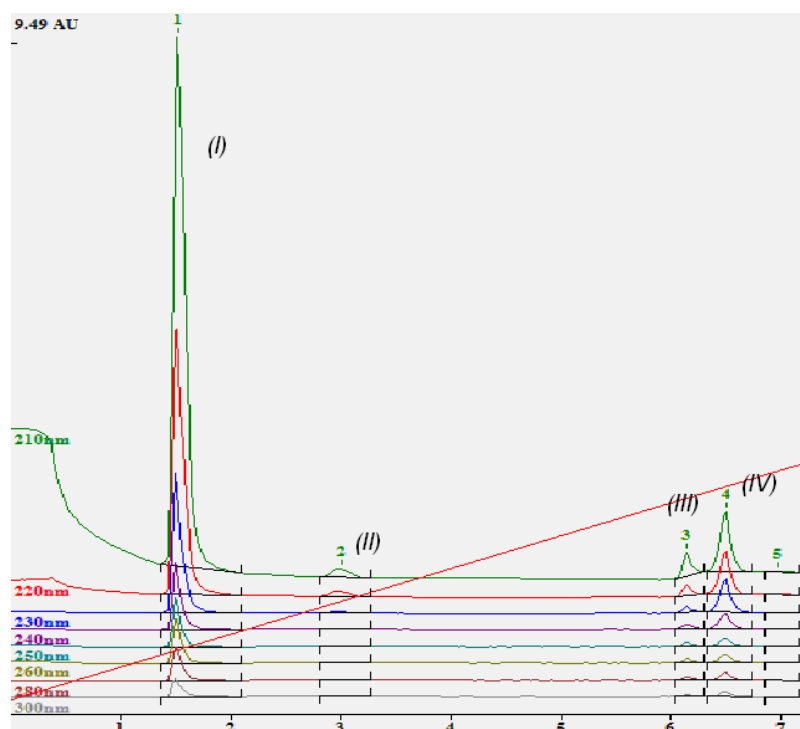


Рис. 3. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селенита натрия и восстановленного глутатиона (pH = 7,0)

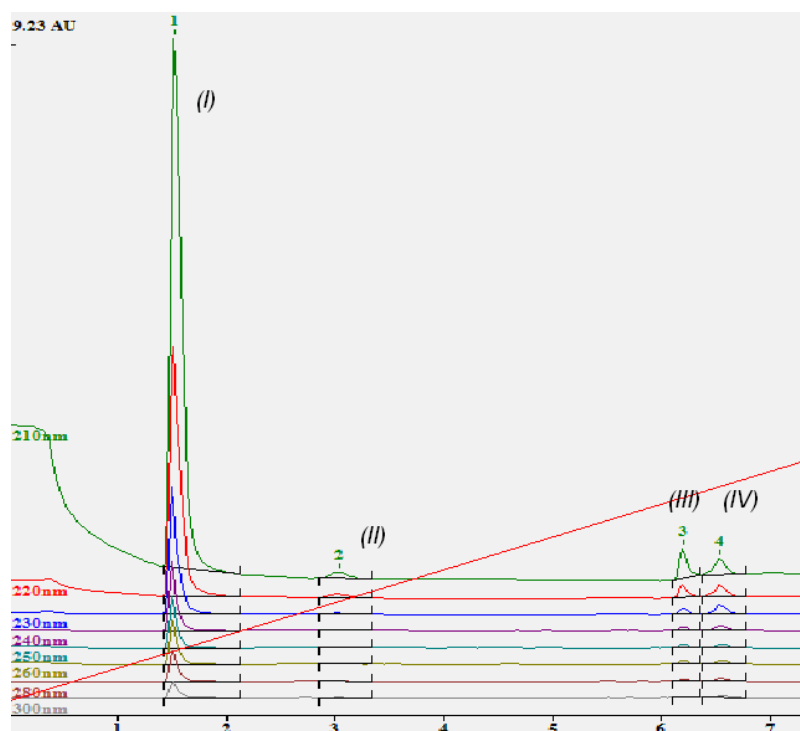


Рис. 4. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селенита натрия и восстановленного глутатиона (pH = 9,0)

При увеличении значения pH до 4,0 (см. рис. 2) происходит последовательное увеличение площади пика (концентрации) гидроселенид-аниона/селеноводорода (**I**) при одновременном уменьшении площади пиков восстановленного (**II**) и окисленного глутатиона (**III**), а также селендиглутатиона (**IV**). Данная тенденция сохраняется при дальнейшем увеличении pH до 7 и 9 (см. рис. 3, 4).

В литературе [9] имеются данные о максимумах поглощения газообразного сероводорода (H_2S $\lambda_{\text{max}} \approx 196$ нм) и селеноводорода (H_2Se $\lambda_{\text{max}} \approx 214$ нм). Исследование спектра поглощения пика гидроселенид-аниона/селеноводорода в остановленном потоке представлено на рис. 5.

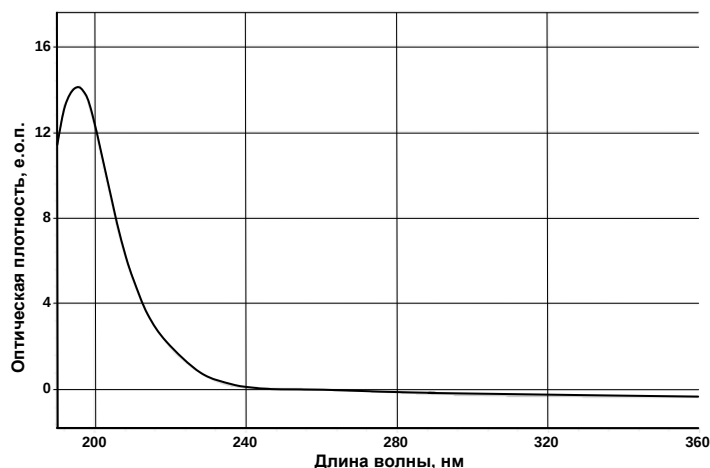


Рис. 5. Спектр поглощения гидроселенид-иона в остановленном потоке

Максимум поглощения у селенид-аниона в нашей работе приходится на 196 нм.

Селендиглутатион – устойчивое соединение, имеющее по литературным данным полосу поглощения 260–380 нм [2, 3]. В нашей работе максимум поглощения селендиглутатиона приходится на 225 нм, хотя и имеет широкую полосу поглощения – 210–360 нм (рис. 6).

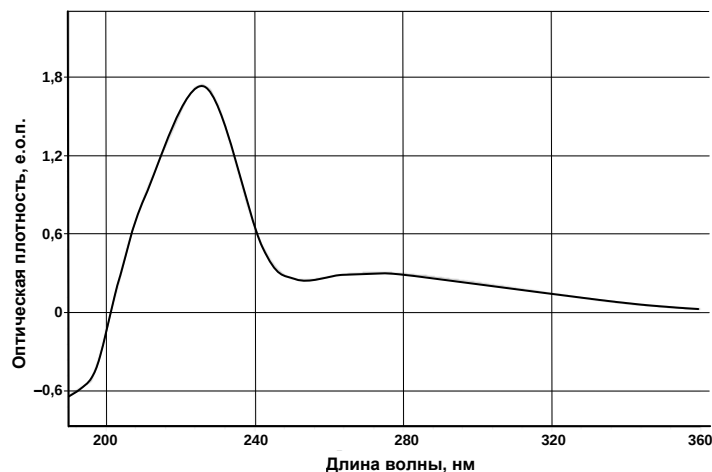


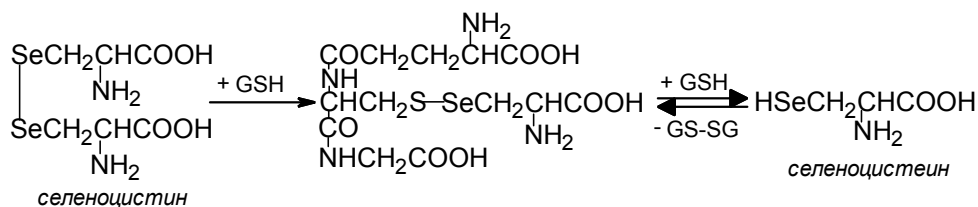
Рис. 6. Спектр поглощения селендиглутатиона в остановленном потоке

По-видимому, эти различия в данных зависят как от фазы (газ, жидкость), так и от особенностей (pH элюента, остаточное давление в системе) исследования спектра вещества.

Таким образом, селенит натрия при взаимодействии с восстановленным глутатионом (**II**) образует селенодиглутатион (**IV**) в качестве промежуточного продукта (его содержание также зависит от времени) реакции и гидроселенид-анион/селеноводород (**I**) в качестве конечного. Аналогично данная реакция идет и в биологических средах, но из-за ограниченных возможностей утилизации высокотоксичного гидроселенид-аниона в живых организмах дозирование селенита натрия необходимо строго контролировать.

Основными источниками селена для животных и человека являются аминокислоты селенометионин (Sem) и селеноцистеин (Sec) – окисленная форма селеноцистин (Sec-Sec) [5]. Селеноцистеин (Sec) – 21-я протеиногенная аминокислота, которую на матричной РНК кодирует терминирующий кодон UGA при условии, что за ним следует особая стимулирующая последовательность нуклеотидов [10]. Это самое значимое природное соединение селена, а все остальные – найденные в природных источниках – либо лежат на пути его биосинтеза (интермедиаты), либо являются его метаболитами.

По литературным данным [11, 12] после перорального введения животным селеноцистин (Sec-Sec) взаимодействует с восстановленным глутатионом с образованием селеноцистеин-глутатиона селеносульфида (Sec-SG). Отмечается, что данная реакция проходит в тонком кишечнике. На втором этапе Sec-SG неферментативно восстанавливается до селеноцистеина (Sec) избытком GSH в печени. Было также признано, что Sec-SG может ферментативно метаболизирован в Sec с участием глутатионредуктазы в присутствии НАДФН:



И только на третьем этапе селеноцистеин расщепляется селеноцистеин-β-лиазой (классификационный номер фермента 4.4.1.16) до селеноводорода H₂Se и аминокислоты аланина [13]. Таким образом, в отличие от неорганических форм селена процесс образования гидроселенид-аниона из селеноцистеина контролируется ферментативно.

В сильноокислом растворе (pH = 1,8) и молярном соотношении 1:1 реакция между селеноцистином и восстановленным глутатионом не идет, по-видимому, из-за подавления диссоциации SH-группы и нуклеофильных свойств атома серы. На хроматограмме отчетливо виден пик селеноцистина (**V**) и пик восстановленного глутатиона (**II**) (рис. 7).

В нейтральной среде (pH = 7) происходит объединение пиков, характеризующих селеноцистин и восстановленный глутатион в один – селеноцистеин-глутатиона селеносульфид (**VI**) (рис. 8).

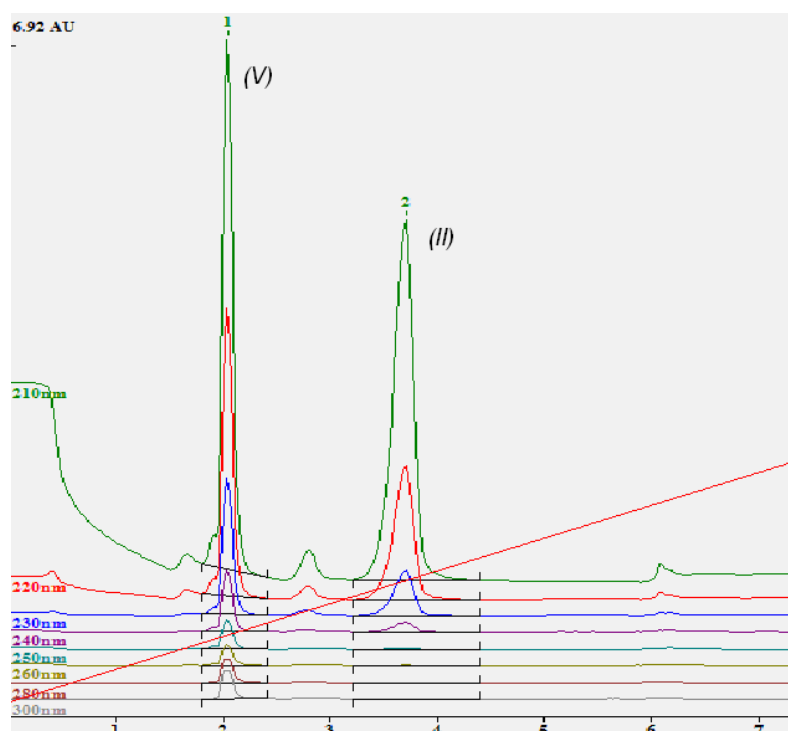


Рис. 7. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селеноцистина и восстановленного глутатиона (pH = 2,8)

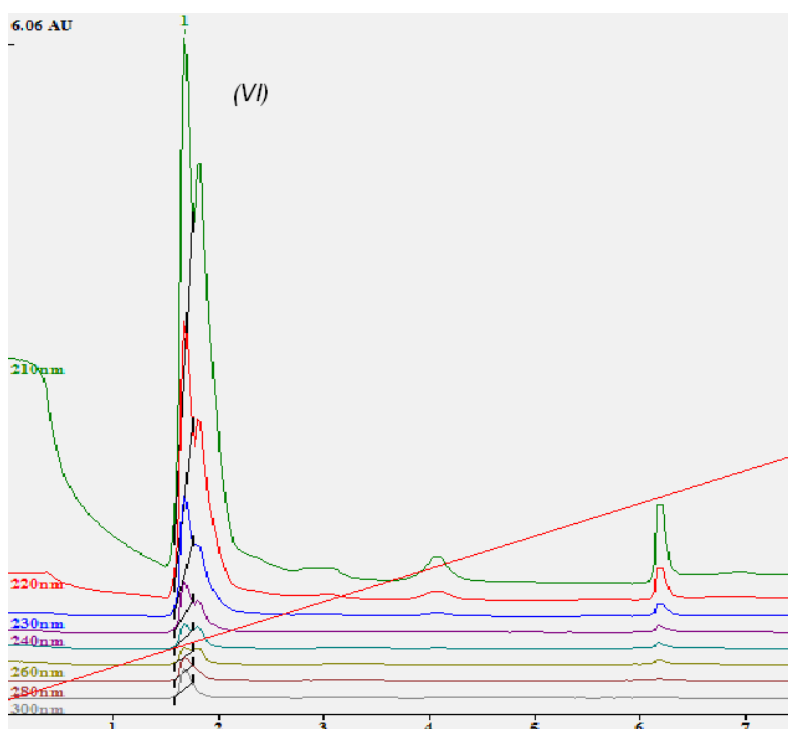


Рис. 8. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии селеноцистина и восстановленного глутатиона (pH = 7)

Увеличение концентрации восстановленного глутатиона в 2 раза, выдержка раствора в течение часа и последующее хроматографирование не изменили площадь и форму пика селеноцистеин-глутатиона селеносульфида (VI).

Таким образом, проведенные исследования показали, что аминокислота селеноцистин, взаимодействуя с восстановленным глутатионом, образует только промежуточный продукт – селеноцистеин-глутатиона селеносульфид (VI) в отличие от селенита натрия, который восстанавливается до гидроселенид-аниона/селеноводорода (I). Это является весьма важным преимуществом селеноцистина как препарата, который может использоваться для устранения селенодефицита в питании человека и рационах животных.

Список литературы

1. **Гореликова, Г. А.** Нутрицевтик селен: недостаточность в питании, меры профилактики (обзор) / Г. А. Гореликова, Л. А. Маюрникова, В. М. Позняковский // Вопросы питания. – 1997. – № 5. – С. 18–21.
2. **Gather, H. E.** Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid / H. E. Gather // Biochemistry. – 1968. – Vol. 7. – P. 2898–2905.
3. **Gather, H. E.** Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase / H. E. Gather // Biochemistry. – 1971. – Vol. 10. – P. 4089–4098.
4. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro / Y. Seko, Y. Saito, J. Kitahara, N. Imura // Selenium in biology and medicine. – 1989. – Vol. 10. – P. 333–339.
5. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности: обзорная информация / И. В. Гмошинский, В. К. Мазо, В. А. Тутельян, С. А. Хотимченко // Экология моря. – 2000. – № 4. – С. 83–86.
6. **Klayman, Daniel L.** Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. A Facile Method for the introduction of selenium into organic molecules / Daniel L. Klayman, T. Scott Griffin // Journal of the American Chemical Society. – 1973. – Vol. 95, № 1. – P. 197–199.
7. **Азарова, И. Н.** Применение перхлората лития в обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии аминокислот / И. Н. Азарова, Г. И. Барам // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т. 14, вып. 1. – С. 65–74.
8. Изучение конкурентного взаимодействия ионов серебра с цистеинсодержащими пептидами и серосодержащими аминокислотами с помощью ESI-MS / А. В. Новиков, Р. А. Бубляев, Н. В. Краснов, Ю. П. Козьмин, Т. Е. Кураева, О. А. Миргородская // Научное приборостроение. – 2007. – Т. 17, № 4. – С. 29–36.
9. **Косяков, А. В.** Построение фазовых диаграмм и регулирование состава промежуточных фаз в системах Ga-Ni, Ga-Cu, In-S и In-Se при использовании вспомогательного компонента : автореф. дис. ... канд. хим. наук / Косяков А. В. – Воронеж, 2010. – 18 с.
10. Functional Characterization of the Eukaryotic Secis Elements which Direct Selenocysteine Insertion at UGA Codons / M. J. Berry, L. Banu, J. W. Harney, P. R. Larsen // The EMBO Journal. – 1993. – Vol. 12, № 8. – P. 3315–3322.
11. Chemical form of selenium-containing metabolite in small intestine and liver of mice following orally administered selenocystine / T. Hasegawa, M. Mihara, T. Okuno, K. Nakamuro, Y. Sayato // Arch. Toxicol. – 1995. – Vol. 69. – P. 312–317.
12. Identification and metabolism of selenocysteine-glutathione selenenyl sulfide (CySeSG) in small intestine of mice orally exposed to selenocystine / T. Hasegawa, T. Okuno, K. Nakamuro, Y. Sayato // Arch. Toxicol. – 1996. – Vol. 71. – P. 39–44.

13. Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine / N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka, K. Soda // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 4386–4391.

References

1. Gorelikova G. A., Mayurnikova L. A., Poznyakovskiy V. M. *Voprosy pitaniya* [Problems of feeding]. 1997, no. 5, pp. 18–21.
2. Gather H. E. *Biochemistry*. 1968, vol. 7, pp. 2898–2905.
3. Gather H. E. *Biochemistry*. 1971, vol. 10, pp. 4089–4098.
4. Seko Y., Saito Y., Kitahara J., Imura N. *Selenium in biology and medicine*. 1989, vol. 10, pp. 333–339.
5. Gmshinskiy I. V., Mazo V. K., Tutel'yan V. A., Khotimchenko S. A. *Ekologiya morya* [Sea ecology]. 2000, no. 4, pp. 83–86.
6. Klayman Daniel L., Griffin Scott T. *Journal of the American Chemical Society*. 1973, vol. 95, no. 1, pp. 197–199.
7. Azarova I. N., Baram G. I. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorptive and chromatographic processes]. 2013, vol. 14, iss. 1, pp. 65–74.
8. Novikov A. V., Bublyaev R. A., Krasnov N. V., Koz'min Yu. P., Kuraeva T. E., Mirgorodskaya O. A. *Nauchnoe priborostroenie* [Scientific instrument engineering]. 2007, vol. 17, no. 4, pp. 29–36.
9. Kosyakov A. V. *Postroenie fazovykh diagramm i regulirovanie sostava promezhutochnykh faz v sistemakh Ga-Ni, Ga-Cu, In-S i In-Se pri ispol'zovanii vspomogatel'nogo komponenta: avtoref. dis. kand. khim. nauk* [Constructing phase diagrams and regulation of the composition of intermediate phases in systems Ga-Ni, Ga-Cu, In-S and In-Se when using an auxiliary component: author's abstract of dissertation to apply for the degree of the candidate of chemical sciences]. Voronezh, 2010, 18 p.
10. Berry M. J., Banu L., Harney J. W., Larsen P. R. *The EMBO Journal*. 1993, vol. 12, no. 8, pp. 3315–3322.
11. Hasegawa T., Mihara M., Okuno T., Nakamuro K., Sayato Y. *Arch. Toxicol.* 1995, vol. 69, pp. 312–317.
12. Hasegawa T., Okuno T., Nakamuro K., Sayato Y. *Arch. Toxicol.* 1996, vol. 71, pp. 39–44.
13. Esaki N., Nakamura T., Tanaka H., Soda K. *J. Biol. Chem.* 1982, vol. 257, pp. 4386–4391.

Полубояринов Павел Аркадьевич

кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент, кафедра физики и химии,
Пензенский государственный
университет архитектуры и строительства
(Россия, г. Пенза, ул. Г. Титова, 28)

E-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

Poluboyarinov Pavel Arkadyevich

Candidate of agricultural sciences, associate
professor, sub-department of physics
and chemistry, Penza State University
of Architecture and Construction
(28 G. Titova street, Penza, Russia)

Моисеева Инесса Яковлевна

доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой общей
и клинической фармакологии, декан
лечебного факультета, Пензенский
государственный университет (Россия,
г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: moiseeva_pharm@mail.ru

Moiseeva Inessa Yakovlevna

Doctor of medical sciences, professor, head
of sub-department of general and clinical
pharmacology, dean of the faculty
of general medicine, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Глебова Наталья Николаевна

старший преподаватель, кафедра общей
и клинической фармакологии, Пензенский
государственный университет (Россия,
г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: natali.glebova@gmail.com

Glebova Natali Nikolaevna

Senior lecturer, sub-department of general
and clinical pharmacology, Penza State
University (40 Krasnaya street, Penza,
Russia)

УДК 543.621, 543.641

Полубояринов, П. А.

Определение продуктов взаимодействия селенита натрия и аминокислоты селеноцистина с восстановленным глутатионом методом ВЭЖХ /
П. А. Полубояринов, И. Я. Моисеева, Н. Н. Глебова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2016. – № 4 (16). – С. 77–87. DOI: 10.21685/2307-9150-2016-4-7