

## АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРНОЗИНА

**Д.А. Фадеева, М.А. Халикова**  
**Е.Т. Жиликова, О.О. Новиков**  
**М.Ю. Новикова, Н.Н. Попов**  
**В.Н. Сорокопудов**

*Белгородский  
государственный  
университет*

*e-mail: novikov@bsu.edu.ru*

Обзор посвящен обобщению существующих методов анализа карнозина ( $\beta$ -аланил-L-гистидина) — дипептида, широко встречающегося в тканях животных и человека.

Ключевые слова: карнозин, дипептид, ВЭЖХ, ТСХ, УФ-спектрофотометрия.

Карнозин ( $\beta$ -аланил-L-гистидин) — дипептид природного происхождения, широко встречающийся в тканях животных и человека (рисунок). Физико-химические свойства карнозина приведены в таблице.

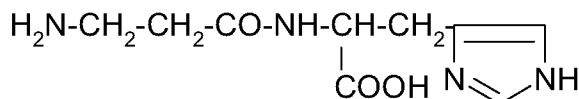


Рис. Структурная формула карнозина

Таблица  
**Физико-химические свойства карнозина**

Брутто-формула	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
Молекулярная масса, г/моль	226,2
Внешний вид	Бесцветные иглы
Растворимость в воде, г/100мл	32,0
Растворимость в этаноле, г/100мл	нерастворим
Удельное оптическое вращение [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> 1%-ного раствора в H <sub>2</sub> O	+21,9
Температура плавления, °С	260-262 (разл.)
pKa	2,62 (COOH) 6,66 (имидазол) 9,24 (NH <sub>2</sub> )

Карнозин, являясь дипептидом, обладает свойствами, характерными для свободных аминокислот (амфотерность, образование шиффовых оснований, комплексных соединений с ионами металлов, взаимодействие с нингидрином и др.), кроме того, наличие в молекуле карнозина имидазольного цикла обуславливает ряд специфических свойств карнозина, таких как способность вступать в реакцию азосочетания, усиление основных свойств соединения [5].

Карнозин был открыт в 1900 году В.С. Гулевичем при исследовании экстрактов мясного фарша [10]. Открытие карнозина в составе мышечной ткани поставило перед исследователями проблему его биологической активности. К настоящему времени продемонстрирована способность карнозина защищать клетки от окислительного стресса, а также увеличивать их устойчивость при избыточной функциональной нагрузке и при накоплении возрастных изменений [1, 9]. Являясь сильным антиоксидантом, данное соединение обладает антикатарактальным, репаративным, антиишемическим действием [4, 23, 26, 27].

В последние годы возрос интерес к карнозину как к действующему лекарственному веществу: в России и за рубежом создаются биологически активные добавки и лекарственные препараты, содержащие карнозин [2, 8]. Одним из важнейших этапов создания новых лекарственных препаратов является обеспечение и контроль их качества, для чего необходимо соответствующее аналитическое обеспечение. Целью данного обзора является систематизация и обобщение существующих методов, применяемых для определения карнозина, а также рассмотрение возможности их применения для целей фармацевтического анализа.

Наиболее часто для качественного и количественного определения карнозина применяются хроматографические [15, 19, 22] и спектральные [7, 12] методы анализа.

Хроматографические методы используются как для идентификации, так и для количественного определения карнозина. Метод бумажной хроматографии, использовавшийся для качественного и полуколичественного анализа и разделения аминокислот и пептидов на протяжении десятков лет, однако, не утратил своей актуальности благодаря простоте и экономичности исполнения. Кроме того, данный метод не требует сложного аппаратного оформления. Так, для разделения анзерина и карнозина проводили хроматографию на бумаге Whatman (23x25 см) с использованием в качестве растворителя систему бутан-2-он-пропионовая кислота-вода (75:25:30, об.). Для обнаружения гистидинсодержащих пептидов на хроматограммах, к которым принадлежит и карнозин, применяют реактив Паули (N-концевой гистидин в составе пептида дает чаще коричневую окраску, а не розовую, как обычно), растворы нингидрина.

Благодаря надежности и эффективности, метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) часто используется в анализе пептидов. Важным преимуществом данного метода является возможность одновременного анализа нескольких образцов при малом расходе мобильной фазы. Хроматографирование проводят на силикагелевых пластинах в системах хлороформ-метанол-25%-ный раствор аммиака (3:3:1, об.), бутанол-уксусная кислота – вода, (4:1:5, об.), изопропанол-вода-25%-й водный аммиак (6:1:3, об.), проявляли хроматограммы раствором нингидрина в ацетоне и хлортолидиновым реактивом. В другом исследовании перед процедурой ТСХ исследуемые образцы обрабатывали 7-хлоро-4-нитробензено-2-гидрокси-1,3-диазолом (НБД-хлорид), разделяли и исследовали спектрофотометрически при длине волны 456-470 нм [3].

Для определения карнозина широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Существует множество работ по определению карнозина данным методом в мышцах рыб [17], птиц [25], мышцах [18] и плазме [21] млекопитающих, тканях мозга [24]. С помощью ВЭЖХ определялось содержание карнозина в продуктах питания на предмет их животного происхождения [15, 22].

Для определения карнозина использовались прямо- и обращеннофазная ВЭЖХ, в качестве сорбента использовались различные марки силикагеля [19]. Подвижной фазой служили фосфатный буфер (0,1М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) с показателем pH 2,1 и 8,5 [3], смесь фосфатного буфера и 0,13%-ного раствора гептафторбутировой кислоты [24], смесь ацетатного буфера (25мМоль, pH6,5) и ацетонитрила (градиент фаз 85%:15%; 60%:40%; 30%:70%) [12], смесь ацетатного буфера и метанола [18] и др. Детекцию полученных хроматограмм осуществляли с помощью УФ-спектроскопии [3], масс-спектроскопии [25], флуориметрии [18], радиохроматографически [24].

Коллектив итальянских ученых исследовал содержание карнозина в молоке овец [8]. Для этой цели была использована высокоэффективная жидкостная хроматография. Подвижной фазой служила система ацетонитрил – смесь растворов хлороводородной кислоты (6 мМоль/л) и натрия хлорида (0,48 мМоль/л) (5%:95%, об.). Температура колонки – 50°C. Детекция осуществлялась спектрофотометрически после обработки элюатов *o*-фталевым ангидридом. Содержание карнозина в молоке составило  $9,17 \pm 0,89$  нМоль/мл.

Рядом исследователей осуществлялась идентификация методом ВЭЖХ N- $\alpha$ -ацетилкарнозина как пролекарства карнозина, устойчивого к действию карнозины [3].

Коллектив американских ученых использовали метод ВЭЖХ для количественного определения карнозина при исследовании механизмов его транспорта из кровяного русла в спинномозговую жидкость [24]. Эпителиальные клетки хориоидального сплетения мозга крыс были выдержаны в растворах карнозина, содержащего радиоактивный изотоп  $^3\text{H}$ . Затем клетки были трижды промыты в ледяном буфере и солиобилизованы в 0,5 мл 0,2-молярного раствора натрия гидроксида и 1%-ного раствора натрия додецилсульфата. Полученные образцы были исследованы с помощью обращеннофазной ВЭЖХ. Колонка Alltech (США) размером 250x4,6 мм заполнялась силикагелем Nupersil ODS с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы была использована смесь 0,1М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 0,13% раствора гептафторбутировой кислоты. Скорость элюирования составляла 1 мл/мин, анализ проводился при комнатной температуре (23 °С). Время удерживания карнозина – 18,5 минут. Детекция карнозина осуществлялась на радиохроматографическом детекторе FLOONE 500TR.

Метод ВЭЖХ, широко используемый для определения карнозина и его производных, однако, не всегда удобен из-за его низкой пропускной способности и большой продолжительности исследований. Кроме того, существующие методики не адаптированы к задачам фармацевтического анализа.

Метод ионообменной хроматографии широко используется в идентификации и количественном определении аминокислот и пептидов, так как он более универсален и высокочувствителен нежели ВЭЖХ. Для анализа карнозина использовались как катион- так и анионообменные колонки с нингидриновым детектором [3]. В качестве подвижной фазы использовались цитратный буфер (0,35 моль/л или 0,38 моль/л, pH 5,28 или 4,14, соответственно), а также раствор гидроксида натрия (100 ммоль/л) [20].

Немаловажную роль в анализе карнозина занимает и спектрофотометрия. С помощью данного метода возможно осуществить как идентификацию, так и количественное содержание карнозина. Данный пептид определялся как по собственному поглощению при длине волны 210-212 нм [12, 24], так и по максимумам поглощения окрашенных соединений карнозина. В качестве реагентов использовали соли  $\text{Hg}^{2+}$  (максимум поглощения комплекса при  $\lambda = 570$  нм) и  $\text{Cu}^{2+}$  (максимум поглощения комплекса при  $\lambda = 600$  нм) [7], диазотированный *p*-бромоанилин (красное окрашивание), 2,4-динитрофторбензол и его производные (желтое окрашивание) [25], *o*-фталевый ангидрид (максимум поглощения окрашенного соединения при  $\lambda=640$  нм) [8].

Зачастую исследователи использовали параллельно несколько методов для идентификации и количественного определения карнозина. Так, в совместном исследовании российских и американских ученых была изучена кинетика карнозина и *N*- $\alpha$ -ацетилкарнозина в тканях глаза кроликов породы шиншилла. В данном комплексном исследовании применялись методы ВЭЖХ, ТСХ, ионообменной хроматографии [3].

На предмет наличия карнозина и его производных, были исследованы образцы водянистой влаги, из которых экстрагировали имидазолсодержащие соединения, выпаривали досуха, ресуспендировали в фосфатном буфере (0,1М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0, 2,0 мл) и подвергали ВЭЖХ.

Обращеннофазную аналитическую ВЭЖХ проводили с помощью жидкостной хроматографической системы Gilson 714 («Gilson, Villiers Fe Bel», Франция). Растворенные, как описано выше, в фосфатном буфере образцы инъецировали в объеме 20 мкл на колонку (250x4,6 мм), наполненную носителем Partisil 5 мкм ODS-3 («Anachem Ltd», Великобритания). Элюирование проводили изократически фосфатным буфером (0,1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 2,1) при 20 °С в течение 25 мин со скоростью 1,0 мл/мин. Поглощение элюатов оценивали при длине волны 210 нм. Аминокислоты определяли по поглощению карбоксильной группы при 200 нм, а пептиды – по поглощению карбоксилата и пептидной связи (200-220 нм).

После депротеинизации образцов водянистой влаги, солиобилизации в этаноле и высушивания 100-200 мкл экстрактивных проб подвергали ионообменной хроматографии, используя аминокислотный анализатор Chromaspec («Rank Hilger», Великобритания), оснащенный колонкой Dowex с ионообменной смолой и двухканальным



нингидриновым детектором. Каждое разделение калибровали стандартной смесью всех аминокислот (100 нмоль/мл каждая) и внутреннего стандарта  $\beta$ -тиенилаланина. Предел обнаружения составлял 14 нмоль на 1 мл пробы для каждой аминокислоты. Аминокислоты элюировали в стандартном режиме буферами с рН в диапазоне 2,2-11,5, под давлением и при 40°.

После удаления водно-этанольного раствора под вакуумом экстракты водянистой влаги концентрировали и продукты биотрансформации N $\alpha$ -ацетилкарнозина идентифицировали с помощью ТСХ на силикагелевых пластинах 60Н («Merck»). Хроматографию проводили в системе хлороформ-метанол-25%-ный водный раствор аммиака (3:3: 0,5, либо 3:3:1, по объему) и окрашивали раствором нингидрина в ацетоне. Значение R<sub>f</sub> карнозина составило 0,27.

В отдельной серии экспериментов изучали кинетику проникновения L-карнозина в изолированные хрусталики кролика (исследовалось пять хрусталиков). Чтобы оценить способность хрусталика накапливать карнозин, его помещали в раствор L-карнозина (5 мМ или более высокой концентрации) в солевой среде Хенкса (без бикарбоната, рН 7,4), содержащей 7 мМ глюкозы, и инкубировали при комнатной температуре (20°C). Через 1 ч проводили процедуру экстракции, чтобы выделить карнозин из небелковой фракции линзы. Выделенную небелковую фракцию фиксировали путем обработки реактивом 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1, 3-диазолом (НБД-хлоридом), а затем подвергали ТСХ в системе растворителей этанол-вода (77:23). Концентрацию карнозина в пробе определяли спектрофотометрически, по характеристическому поглощению при 420/600 нм на двулучевом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония).

Помимо вышперечисленных, в литературе встречаются и другие методы анализа карнозина: микробиологическое определение, протонный магнитный резонанс, капиллярный электрофорез, микродиализ, масс-спектрометрия [6, 11, 13, 14, 16].

Обобщая обзор методов анализа карнозина, важно отметить значительный спектр уже существующих и применяемых методик. Однако, они далеко не универсальны, так как применяются чаще всего при биохимических исследованиях, и, зачастую, требуют сложного технического исполнения и длительной подготовки; большинство из них достаточно дорогостоящи. Очевиден недостаток методик фармацевтического анализа карнозина. Таким образом, необходима адаптация существующих и разработка новых методик, применимых для анализа данного перспективного соединения в объектах различного происхождения, в том числе, в лекарственных формах.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Государственный контракт № 14.740.11.0119 от 08 сентября 2010 года, проект «Комплексные фармакологические и технологические исследования ряда субмикроструктурированных (наноструктурированных) фармацевтических субстанций с доказанными измененными физико-химическими свойствами».

### Литература

1. Болдырев, А.А. Карнозин: эндогенный физиологический корректор активности антиоксидантной системы организма [Текст] / А.А. Болдырев, С.Л. Стволинский, Т.Н. Федорова // Усп. физиол. наук. – 2007. – № 38(3). – С.57-71.
2. Майчук, Ю.Ф. Эффективность применения капель карнозина в терапии заболеваний и при эксимерлазерной хирургии роговицы [Текст] / Ю.Ф. Майчук [и др.] // Офтальмол. журн.-2000. – №4. – С.24-25.
3. Babizhayev, M. A. The Natural Histidine-Containing Dipeptide N-alpha-Acetylcarnosine as an Antioxidant for Ophthalmic Use [Text] / M.A.Babizhayev [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2000. – Vol. 65, №5. – P. 691-704.
4. Babizhayev, M.A. Rejuvenation of visual functions in older adult drivers and drivers with cataract during a short-term administration of N-acetylcarnosine lubricant eye drops [Text] / M.A. Babizhayev // Rejuvenation Res. – 2004. – №7(3). – P.186-198.
5. Baran, E. J. Metal Complexes of Carnosine [Text] / E. J. Baran // Biochemistry (Moscow). – 2000. – Vol. 65, № 7. – P. 928-937.



6. Chen, Y.-H. Mass spectrometric determination of dabsyl-chloride derivatised anserine, carnosine and taurine in commercial chicken essences [Text] / Y.-H. Chen [et al.] // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2007. – Vol. 42, № 5. – P.593-600.
7. Coddou, C. Formation of carnosine-Cu(II) complexes prevents and reverts the inhibitory action of copper in P2X4 and P2X7 receptors [Text] / C. Coddou [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2002. – Vol.80. – P.626-633.
8. Ducci, M. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method [Text] / M. Ducci [et al.] // *Pol J Vet Sci*. – 2006. – Vol.9, №3. – P.159-163.
9. Guiotto, A. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review [Text] / A. Guiotto [et al.] // *Curr Med Chem*. – 2005. – Vol.12, №20. – P.2293-2315.
10. Gulewitsch, W.S. Uber das Karnosin, Eine Neue Organische Base des Fieischextrakt [Text] / W.S. Gulewitsch, S. Amiradzibi // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* – 1900. – B.33. – S.1902-1903.
11. Gutierrez, D. Amino acid concentration in the interstitium of human skeletal muscle: a microdialysis study [Text] / D. Gutierrez, F. Anderstam, A. Alvestrand // *European Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – Vol. 29, № 11. – P. 947-952.
12. Huang, S.-C. Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain [Text] / S.-C. Huang, J. C.-C. Kuo // *Proc. Natl. Sci. Counc.* – 2000. – Vol. 24, № 4. – P. 193-201.
13. Huang, Y. On-line sample stacking for determination of carnosine-related peptides by capillary electrophoresis [Text] / Y. Huang [et al.] // *Chinese Journal Of Chromatography*. – 2007. – Vol. 25, №3. – P. 326-331.
14. Huang, Y. Separation and determination of carnosine-related peptides using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [Text] // Y. Huang [et al.] // *Electrophoresis*. – 2005. – Vol. 26, №3. – P. 593-599.
15. Kantha, S. S. HPLC Determination of Carnosine in Commercial Canned Soups and Natural Meat Extracts [Text] / S. S. Kantha [et al.] // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. – 2000. – Vol. 33, №1. – P. 60-62.
16. Mahir, S. Absolute quantification of carnosine in human calf muscle by proton magnetic resonance spectroscopy [Text] / S. Mahir [et al.] // *Physics in Medicine & Biology*. – 2007. – Vol. 52, №23. – P.6781-6794.
17. Masataka, S. Determination of anserine and carnosine contents in fish muscles by using high performance liquid chromatography [Text] / S. Masataka, K. Naomichi // *Joshi Eiyo Daigaku Kiyō*. – 2004. – Vol.35. – P.57-59.
18. Maynard, L. M. High levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle [Text] / L. M. Maynard [et al.] // *Journal of Nutrition*. – 2001. – Vol.131. – P.287-290.
19. Mora, L. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine [Text] / L. Mora, M.A. Sentandreu, F.J. Toldra // *Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol.55, №12. – P.4664-4669.
20. Nardiello, D. Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [Text] / D. Nardiello, T.R.I. Cataldi // *Journal of Chromatography*. – 2004. – Vol.1035, № 2. – P. 285-290.
21. Park, Y.J. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef [Text] / Y.J. Park, S.L. Volpe, E.A. Decker // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol.53, № 12. – P.4736-4739.
22. Schonherr, J.J. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography [Text] / J.J. Schonherr // *Agric Food Chem.* – 2002. – Vol. 50, №7. – P.1945-1950.
23. Stvolinsky, S. L. Anti-ischemic Activity of Carnosine [Text] / S. L. Stvolinsky, D. Dobrota // *Biokhimiya*. – 2000. – Vol. 65, №. 7. – P. 998-1005.
24. Teuscher, N. S. Carnosine uptake in rat choroid plexus primary cell cultures and choroid plexus whole tissue from PEPT2 null mice [Text] / N. S. Teuscher [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – Vol.89. – P. 375-382.
25. Tian, Y. Determination of carnosine in Black-Bone Silky Fowl ( *Gallus gallus domesticus* Brisson) and common chicken by HPLC [Text] / Y. Tian [et al.] // *European Food Research and Technology*. – 2007. – Vol. 226. – P.311-314.
26. Wang, A. M. Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for human beings [Text] / A. M. Wang [et al.] // *Biokhimiya*. – 2000. – Vol. 65, №7. – P.1022-1024.



27. Williams, D.L. The effect of a topical antioxidant formulation including N-acetyl carnosine on canine cataract: a preliminary study [Text] / D.L. Williams, P. Munday // *Vet Ophthalmol.* - 2006.- Vol.9, №5.- P.311-316.

## THE ANALYTICAL CHARACTERISTIC OF CARNOSINE

**D.A. Fadeeva, M.A. Khalikova  
E.T. Zhilyakova, O.O. Novikov  
M.Yu. Novikova, N.N. Popov  
V.N. Sorokopudov**

*Belgorod State University*

*e-mail: novikov@bsu.edu.ru*

The review is devoted to summarizing of existing methods of the analysis of carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) – dipeptide, which is widespread in animals' and human's tissues.

Key words: carnosine, dipeptide, HPLC, TLC, UV-spectrophotometry.