

Определение основных низкомолекулярных аминотиолов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС

Иванов А.В., Кудан П.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,
Москва, 125315, ул. Балтийская, д. 8.

В статье представлена новая методика количественного определения общих аминотиолов плазмы — цистеина (Цис), гомоцистеина (гЦис), цистеинилглицина (ЦисГли) и глутатиона (Глн) посредством использования аналитической системы ВЭЖХ-МС с ионизацией электрораспылением. Для проведения анализа аминотиолы образцов плазмы подвергали восстановлению дитиотреитолом (ДТТ) с последующей их дериватизацией *N*-этилмалеимидом (NEM), что позволяло повысить устойчивость к окислению тиольных групп за счет их модификации с одновременным повышением чувствительности МС в десятки раз. Исследована линейность определяемых веществ в диапазоне 2–50 мкМ для гЦис и Глн, 4–100 мкМ для ЦисГли и 20–500 мкМ для Цис. Было показано, что погрешность определения аминотиолов находилась в пределах 10%. Предложенный в работе подход может служить альтернативой другим лабораторным методам одновременного детектирования аминотиолов.

Ключевые слова: аминотиолы, гомоцистеин, цистеин, цистеинилглицин, глутатион, *N*-этилмалеинимид, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), масс-спектрометрия (МС)

Сокращения: Цис — цистеин; гЦис — гомоцистеин; ЦисГли — цистеинилглицин; Глн — глутатион; ПА — пеницилламин; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; МС — масс-спектрометрия; ДТТ — дитиотреитол; ТХУ — трихлоруксусная кислота; МПГ — *N*-(2-меркаптопропионил)глицин; NEM — *N*-этилмалеимид

Введение

Количественное определение содержания низкомолекулярных аминотиолов в различных биоматрицах является трудной и весьма актуальной задачей. Некоторые из них являются молекулярными (биологическими) маркерами целого ряда дисфункций. Большое число опубликованных работ связано с определением содержания общего гомоцистеина в крови для оценки степени заболеваний нервной системы, инфаркта, инсульта, диабета и др. [1, 4, 15, 16].

Методы совместного анализа аминотиолов могут представлять значительный интерес, так как только системный подход может обеспечить выяснение влияния разregуляции аминотиольного обмена в этиологии дисфункций человека.

В ряде работ предложено прямое определение аминотиолов с помощью ВЭЖХ-МС [7, 12] и КЭ-МС [3, 6].

Чувствительность МС во многом определяется эффективностью ионизации аналита. Повысить её можно путем введения в него нуклеофильных групп и/или гидрофобных остатков, что особенно актуально для гомоцистеина, имеющего слабую ионизационную способность в ряду аминокислот.

При подборе реагентов для модификации аналитов необходимо добиться устойчивости к окислению тиольной группы. Для этого нами был использован реагент *N*-этилмалеинимид (NEM), который удовлетворяет всем этим требованиям, являясь быстрым и специфичным блокатором -SH-групп, при этом повышая чувствительность МС к аминотиолам в десятки раз [6].

Материалы и методы

Реактивы

Деионизованная вода (18,2 МОМ*см), этанол-ректификат 96%, муравьиная кислота для ЖХ-МС (Fluka, Германия), Ацетонитрил Ultra-Gradient (Lab-Scan, Ирландия), DL-Дитиотреитол >99,5% (Fluka, Германия), *N*-этилмалеинимид >98% (Sigma, США), трихлоруксусная кислота 99% (Sigma, США), Na₂HPO₄*2H₂O и NaH₂PO₄*2H₂O >98% (Panreac, Испания), ЭДТА-Na*2H₂O 99% (AppliChem, Германия), L-цистеин 97% (Aldrich, США), DL-гомоцистеин 99% (Sigma, США), цистеинилглицин >85% (Sigma, США), пеницилламин >98% (Sigma, США), L-глутатион 99% (Sigma-Aldrich, США), *N*-(2-меркаптопропионил) глицин (Sigma, США).

Оборудование и программное обеспечение

Дозаторы пипеточные Eppendorf Research (Германия) объемами 0,5–10; 10–100 и 100–1000 мкл. Термошейкер Thermomixer compact (Eppendorf, Германия). Центрифуги CM-50 (Elmi, Латвия) и Jouan BR4i (Thermo, США). Холодильник глубокой заморозки MDF-U3086S (Sanyo, Япония). В работе использовали систему ВЭЖХ Perkin Elmer Series 200 с колонкой Dr. Maisch Reprosil-Pur C18-AQ, 3 мкм, 150×2 мм, соединенную с МС Agilent MSD Trap VL через стандартный электрораспылительный интерфейс. Воду для ВЭЖХ деионизировали системой Millipore Simplicity 185 (Франция) оснащенной картриджем Simpак 1. Запись экспериментальных данных осуществляли посредством ПО MSD Trap Control, первичную обработку — в Agilent Data Analysis и QantAnalysis, статистический анализ проводили с помощью Microsoft Excel 2003.

Пробоподготовка

Забор крови

Кровь здоровых доноров забиралась в пробирки BD Vacutainer 9NC, которые сразу охлаждались на ледяной бане в термосе со смесью лед/вода для транспортирования в лабораторию для анализа (срок хранения — 2 ч).

Приготовление рабочих растворов

Стоковые растворы Цис(268 мМ), гЦис(50 мМ), Глн(50 мМ), ЦисГли(50 мМ), пеницилламин (ПА) (50 мМ), МПГ(25 мМ) были приготовлены в 0,1% HCOOH (хранение при -80°C). Для работы из растворов аналитов готовили исходные калибровочные растворы, содержащие 5 мМ Цис, 500 мкМ гЦис и Глн, 1 мМ ЦисГли в деионизированной воде. ПА разбавляли водой до концентрации 100 мкМ, МПГ до 12,5 мкМ в 60 мМ ТХУ. Все рабочие (не стоковые) растворы хранили при 4°C не более 8 ч. Растворы ДТТ (в 20 мМ ЭДТА-Na) и NEM (в этаноле) готовили непосредственно перед использованием. 600 мМ Na_2HPO_4 хранили при 4°C и перед использованием соль полностью растворяли при нагреве до 45°C . 200 мМ Na-фосфатный буфер с pH 7,0 готовили согласно прописи [2].

Подготовка пробы

Охлажденную кровь центрифугировали при 2500 g 10 мин (5°C), затем отбирали плазму. К 50 мкл плазмы добавляли 50 мкл 10 мкМ ПА, 50 мкл 200 мМ Na-фосфатного буфера с pH 7,0 и 50 мкл 40 мМ ДТТ с 20 мМ ЭДТА-Na. Пробу инкубировали 10 мин на термомиксере с интенсивным перемешиванием (60°C). Затем к ним добавляли 22 мкл 0,4М NEM в этаноле, интенсивно встряхивали пробирки и инкубировали 10 мин при комнатной температуре (24°C). Остановку реакции и депротеинизацию образцов осуществляли добавкой 24 мкл 0,6М ТХУ с последующим охлаждением проб (4°C) в холодильнике в течение 30 мин. После образцы центрифугировали при 15000 g 10 мин и отбирали 150 мкл супернатанта, к которому добавляли 225 мкл 0,6М Na_2HPO_4 . Пробу до анализа хранили при -80°C . Непосредственно перед анализом их разводили в 10 раз раствором 12,5 мкМ МПГ в 60 мМ ТХУ. Таким образом, коэффициент разбавления плазмы на этой стадии составлял 123.

Приготовление калибровочных растворов

Для построения калибровочных графиков из рабочей смеси аналитов готовили путем последовательных разбавлений 5 растворов с концентрацией 500, 250, 100, 50 и 20 мкМ Цис; 100, 50, 20, 10 и 4 мкМ ЦисГли; 50, 25, 10, 5 и 2 мкМ гЦис и Глн соответственно. Для калибровки модельной смеси на данной стадии в эти растворы ПА не вносили и все последующие процедуры проводили как при пробоподготовке плазмы крови. Для калибровки по образцам плазмы крови в калибровочные растворы добавляли ПА до концентрации 10 мкМ и их вносили в образцы плазмы вместо раствора чистого стандарта.

Калибровка образцов, оценка воспроизводимости

Для построения калибровочных графиков в качестве матриц использовали как водный раствор аналитов, так и плазму крови. В обоих случаях применяли два внутренних стандарта: МПГ (для Цис, гЦис и ЦисГли) и ПА (для Глн). МПГ вносили в образец непосредственно перед

анализом, в то время как внутренний стандарт пеницилламин подвергался дериватизации вместе с аналитами. Для расчетов использовали отношения площадей пиков NEM-производных аналитов к натриевой форме МПГ или NEM-производному пеницилламина при каждой концентрации аналита, из которых получали параметры калибровочных графиков (наклон и пересечение с осью ординат) с помощью уравнений линейной регрессии. В связи с тем, что аминоктиолы Цис, ЦисГли и Глн в данном методе дают двойные пики, для обработки использовали только первый (по времени выхода) пик из тандема. Для оценки погрешности определений образец плазмы крови инжестировали 6 раз в течение 3 дней.

ВЭЖХ-МС

Анализ проводили с помощью градиентного насоса на два растворителя — 0,1% HCOOH (А) и ацетонитрила (Б). Поток жидкости составлял 0,3 мл/мин, температура колонки 45°C , объем инъекции 20 мкл. Перед началом и по окончании работы колонку промывали 50% А/50% Б в течение 5 мин. Элюцию проводили по следующей программе — 2 мин 100% А/0% Б, 8 мин линейный градиент 100—80% А/0—20% Б, 2,5 мин 40% А/60% Б, 1 мин линейный градиент 40—100% А/60—0% Б и 16 мин регенерация колонки при 100% А. Таким образом, цикл ВЭЖХ в изократическом режиме составлял 30 мин. Параметры работы масс-спектрометра были следующими: поток осушающего газа — 8 л/мин (350°C), давление небулайзера — 30 psi (2,07 бар), потенциал капилляра — 3500 В, целевая масса — 261 m/z (протонированная форма Hcy-NEM), диапазон сканирования 70—500 m/z.

Результаты и обсуждение

Восстановление образцов

Для определения общих аминоктиолов плазмы их необходимо восстановить, так как окислительно-восстановительный потенциал этой среды сильно сдвинут в сторону образования дисульфидов. Наиболее часто для таких целей применяют борогидрид натрия, меркаптоэтанол, ДТТ, трис-(2-карбоэтил)фосфин и др. В данной работе нами использовался реагент ДТТ, поскольку он потребляется в значительно меньших концентрациях, чем борогидрид или меркаптоэтанол. Было показано, что на полную восстановления сильно влияет температура [17] и степень разбавления плазмы. Для последующих стадий дериватизации образца и подготовки к ВЭЖХ-МС разбавление исходного материала должно быть минимальным при сохранении полноты восстановления. Экспериментально было найдено, что 4-кратное разведение плазмы является оптимальным для восстановления аналитов в 50 мМ Na-фосфатном буфере с pH 7,0, содержащем 10 мМ ДТТ и 5 мМ ЭДТА-Na (данные не приводятся) при 10 мин инкубации 60°C .

Оптимизация условий дериватизации N-этилмалеимидом

Реагент NEM в интервале pH ~ 5 —7,0 достаточно специфично реагирует с -SH группами, практически не затрагивая аминогруппы, образуя соответствующие производные соединения. Показано, что в данном диапазоне pH наблюдается стабильный (95—100%) уровень образо-

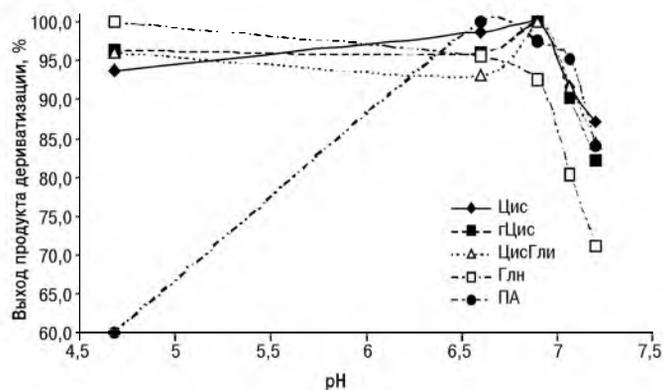


Рис. 1. Зависимость полноты протекания реакции модификации от pH

вания NEM-производных аналитов (рис. 1), в то время как выход ПА-NEM растет линейно с pH и достигает максимума при pH ~6,8. При pH более 7 происходит значительное снижение выхода продуктов.

Подбор внутреннего стандарта (ВС)

Ранее нами [3, 9] для определения гомоцистеина в плазме крови в качестве внутреннего стандарта был использован цистеамин. Однако использование его в качестве стандарта для определения других аминокислот оказалось затруднительно, так как в этом случае наклон калибровочных прямых модельных растворов и образцов плазмы существенным образом отличались (данные не приводятся). В связи с этим были применены ВС-МППГ и ПА (NEM-производное). В табл. 1 приведены коэффициенты наклонов калибровочных прямых модельных растворов и образцов плазмы с использованием МППГ (Na-связанная форма) в качестве стандарта для NEM-производных Цис, гЦис и ЦисГли, а ПА-NEM для определения концентрации глутатиона соответственно. Как видно, при переходе от водного раствора к плазме их разница не превышает 10%, что позволяет считать калибровочные прямые параллельными. Типичная хроматограмма образца плазмы крови с временами удерживания и m/z аналитов приведена на рис. 2. Двойные пики Цис, ЦисГли и Глн, по-видимому, обусловлены образованием диастереомеров при дериватизации и их разделении ВЭЖХ. Использование натриевой формы МППГ обусловлено тем, что протонированная форма этого соединения присутствует в экспериментальных условиях в незначительных количествах и дает слабый по интенсивности сигнал. Эти данные позволяют считать сигнал линейным в исследованном диапазоне, а матричный эффект плазмы компенсируется ВС.

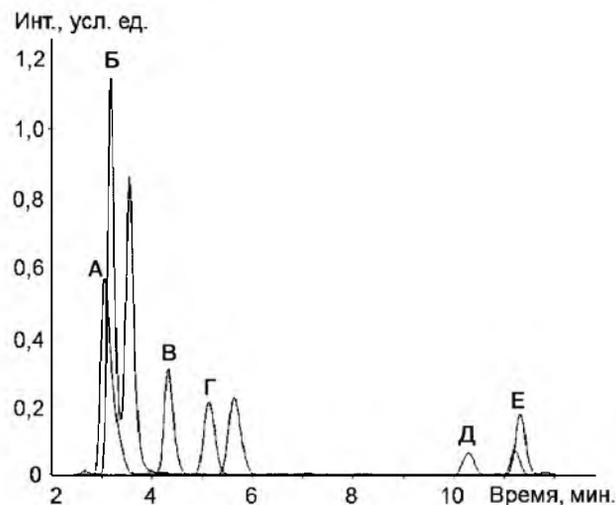


Рис. 2. Хроматограмма основных аминокислот плазмы крови: А – МППГ*Na⁺ (3,1 мин, 186,1 m/z); Б – Цис-NEM (3,2 мин, 247,1 m/z); В – ЦисГли -NEM (4,4 мин, 304,1 m/z); Г – гЦис -NEM (5,2 мин, 261,1 m/z); Д – Глн -NEM (10,3 мин, 433,1 m/z); Е – ПА -NEM (11,3 мин, 275,1 m/z)

Средняя серийная погрешность определения (5 последовательным инъекциям одного образца плазмы за день) соответствовала 6,5%; 3,5%; 7,5 и 3,5 и межсерийная погрешность определения (стандартные отклонения средних значений, определяемых в течение 3 дней) была 5%; 0,5%; 7,5% и 4,5% для гЦис, Цис, ЦисГли и Глн, соответственно. Коэффициенты аналит/стандарт для всех анализов уточнялись по результатам ежедневной калибровки модельного раствора.

Апробация методики

Данная методика была апробирована на 10 образцах плазмы крови здоровых людей. Средние значения со стандартными отклонениями составили Цис 258±16 мкМ, гЦис 9,4±2,3 мкМ, ЦисГли 33,4±3,5 мкМ и Глн 5,0±1,0 мкМ. Эти данные хорошо согласуются с данными литературы [5, 8, 10, 13].

Выводы

В настоящее время используется ряд методов определения аминокислот в биологических жидкостях. Большинство из них основаны на ВЭЖХ/капиллярном электрофорезе с флуоресцентным, реже с УФ- и электрохимическим детектированием. Работы с применением масс-спектрометрии в этой области [7, 12, 14] появились сравнительно недавно. Отличительная особенность МС состоит в возможности прямого детектирования анали-

Таблица

Сравнение коэффициентов наклона калибровочных прямых в модельном водном растворе и образцах плазмы крови

Аналит/стандарт	Коэф. наклона ± станд. откл.		Коэф. корреляции	
	Модель	Плазма (n=4)	Модель	Плазма
Цис/МППГ	4,9	4,7±0,4	0,996	0,991
гЦис/МППГ	2,4	2,3±0,3	0,999	0,994
ЦисГли/МППГ	2,5	2,5±0,2	0,999	0,989
Глн/ПА	12,9	13,7±0,5	0,999	0,998

тов, т.е. не требуется проведение дериватизации, и чувствительность современного оборудования позволяет достигать требуемой чувствительности для анализа основных аминокислот плазмы. Однако, необходимо учитывать, что эти соединения нестабильны при хранении и пробоподготовке, окисляясь кислородом и его активными формами. При этом присутствующие в плазме ионы переходных металлов существенно ускоряют процессы окисления. Одним из путей повышения устойчивости аналитов к окислению является их химическая стабилизация дериватизацией, а в случае применения масс-спектрометрии, дериватизация аналитов, как было показано, также может многократно повышать чувствительность [3, 6] и их время удерживания.

Ранее нами был предложен подход для определения фракций гЦис в плазме на основе ВЭЖХ-МС с применением NEM. Этот вариант анализа нами был оптимизирован и использован для определения основных низкомолекулярных тиолов плазмы крови (Цис, гЦис, ЦисГли и Гли). Предложенный метод сочетает в себе высокую чувствительность, специфичность анализа и в дальнейшем может быть также использован для определения фракционного состава аминокислот.

Список литературы

1. Баранова Е.И., Большакова О.О. Клиническое значение гомоцистеинемии // Артериальная гипертензия. — 2004. — 1, 1. — С. 12–15.
2. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — Мир, 1991. — 359 с.
3. Иванов А.В., Лузянин Б.П., Московцев А.А., Роткина А.С., Кубатиев А.А. Определение восстановленной фракции гомоцистеина в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — 2. — С. 55–60.
4. Шевченко О.П. Гипергомоцистеинемия и её клиническое значение // Лаборатория. — 2002. — 1. — С. 3–7.
5. Amarnath K., Amarnath V., Amarnath K., Valentine H.L., Valentine W.M. A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related amino thiols in biological samples // Talanta. — 2003. — 29. — 60(6). — P. 229–238.
6. D'Agostino L.A., Karen P.L., Lee R., Britz-McKibbin P. Comprehensive Plasma Thiol Redox Status Determination for Metabonomics // J. Proteome Res. — 2011. — 10 (2). — P. 592–603.
7. Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma amino thiols: Application to studies of diabetic nephropathy // Talanta. — 2009. — 77, 4. — P. 1279–1284.
8. Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P.M. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability // Clin. Chem. — 1993. — 39(2). — P. 263–271.
9. Ivanov A.V., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. The use of N-ethylmaleimide for mass spectrometric detection of homocysteine fractions in blood plasma // Bulletin of Exp. Biology and Medicine. — 2012. — 152(3). — P. 289.
10. Ivanov A.R., Nazimov I.V., Baratova L. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. I. Fast qualitative and quantitative, gradient and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometric and fluorescence detection // J. Chromatogr. A. — 2000. — 20. 895(1–2). — P. 157–166.
11. Kang S.S., Wong P.W., Malinow M.R. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease // Annu. Rev. Nutr. — 1992. — 12. — P. 279–298.
12. Li S., Jia J., Liu G., Wang W., Cai Y., Wang Y., Yu C. Improved and simplified LC-ESI-MS/MS method for homocysteine determination in human plasma: application to the study of cardiovascular diseases // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2008. — 870(1). — P. 63–67.
13. Mansoor M.A., Svardal A.M., Schneede J., Ueland P.M. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men // Clin. Chem. — 1992. — 38(7). — P. 1316–1321.
14. Rafii M., Elango R., House J.D., Courtney-Martin G., Darling P., Fisher L., Pencharz P.B. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography B. — 2009. — 877. — 28. — P. 3282–3291.
15. Taylor L.M., Porter J.M. Elevated plasma homocysteine as a risk factor for atherosclerosis // Semin. Vasc. Surg. — 1993. — 6(1). — P. 36–45.
16. Welch G.N., Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis // N. Engl. J. Med. — 1998. — 338(15). — P. 1042–1050.
17. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // J. Chromatography B. — 2004. — 800. — P. 275–280.

Determination of the main low molecular weight amino thiols in blood plasma using HPLC-MS method

Ivanov A.V., Kudan P.V., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A.

Herein we describe the new sensitive method using the high-performance liquid chromatography-mass-spectrometry (HPLC-MS) assay with electrospray ionization (ESI) for the quantitative detection of total amino thiols (cysteine, homocysteine, cysteine-glycine, and glutathione) in plasma. The disulfide bonds were reduced by dithiothreitol (DTT) followed by its derivatization by N-ethylmaleimide (NEM) to raise the thiol group resistance to an oxidation due to its modification as well as simultaneous to raise ten-fold in the MS detection receptiveness. The calibration curves were linear over the concentration range of 2–50 μM for homocysteine and glutathione, of 4–100 μM for cysteine-glycine, and of 20–500 μM for cysteine. The coefficients of variation for the thiols detections were about 10%. Our proposed approach may be used as the alternative method for the simultaneous detection of the main low molecular weight amino thiols.

Key words: amino thiols, homocysteine, cysteinylglycine, glutathione, N-ethylmaleimide, high performance liquid chromatography (HPLC), mass-spectrometry (MS)