

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.М. Дорошенко *, О.М. Балаева-Тихомирова **

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

**Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

В статье представлены данные о последовательности этапов количественного анализа спектра свободных аминокислот сыворотки крови человека и экспериментальных животных, а также спектров свободных аминокислот печени экспериментальных животных.

Цель исследования – оптимизировать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения свободных аминокислот с использованием оборудования компании Agilent.

Материал и методы. *В работе представлены этапы анализа спектров свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: забор биологического материала, пробоподготовка образцов тканей и плазмы, определение свободных аминокислот и родственных соединений (сорбент и параметры колонки, предколоночная дериватизация, оптимизация условий разделения, порядок элюирования определяемых соединений, профиль градиентного элюирования).*

Результаты и их обсуждение. *Приведены примеры хроматограмм стандартной смеси аминокислот и их производных, хроматограммы свободных аминокислот и их производных плазмы крови и хроматограммы свободных аминокислот и их производных хлорнокислого экстракта ткани печени крысы.*

Заключение. *С помощью представленного метода удается определять до 43 свободных аминокислот и их производных, что существенно повышает информативность исследований обмена и транспорта аминокислот в биологических объектах.*

Ключевые слова: *высокоэффективная жидкостная хроматография, свободные аминокислоты, плазма крови, печень.*

STUDY OF THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS OF BLOOD SERUM AND LIVER WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ye.M. Doroshenko*, O.M. Balayeva-Tikhomirova**

*Education Establishment "Grodno State Medical University"

**Education Establishment "Vitebsk State P.M. Masherov University"

The article presents data on the sequence of stages of quantitative analysis of the spectrum of free amino acids in the blood serum of humans and experimental animals, as well as the spectra of free amino acids in the liver of experimental animals.

The aim of study is to optimize method of high-performance liquid chromatography for the identification of free amino acids using equipment from Agilent.

Material and methods. *The paper presents the stages of analysis of the spectra of free amino acids by high-performance liquid chromatography: sampling of biological material, preparation of tissue and plasma samples, identification of free amino acids and related compounds (sorbent and column parameters, pre-column derivatization, optimization of separation conditions, elution order of the compounds to be determined, profile of the gradient elution).*

Findings and their discussion. *Examples of a chromatogram of a standard mixture of amino acids and their derivatives, a chromatogram of free amino acids and their derivatives of blood plasma, and a chromatogram of free amino acids and their derivatives of perchloric acid extract of rat liver tissue are given.*

Conclusion. *Using the presented method, it is possible to identify up to 43 free amino acids and their derivatives, which significantly increases the the informational value of studies of the metabolism and transport of amino acids in biological objects.*

Key words: *high performance liquid chromatography, free amino acids, blood plasma, liver.*

Фонд свободных аминокислот тканей и плазмы крови формируется в результате поступления аминокислот с пищей, их метаболизма, участия в биосинтезе белков тканей и их распада. Простейшая схема распределения свободных аминокислот в печени и плазме крови представлена на рис. 1.

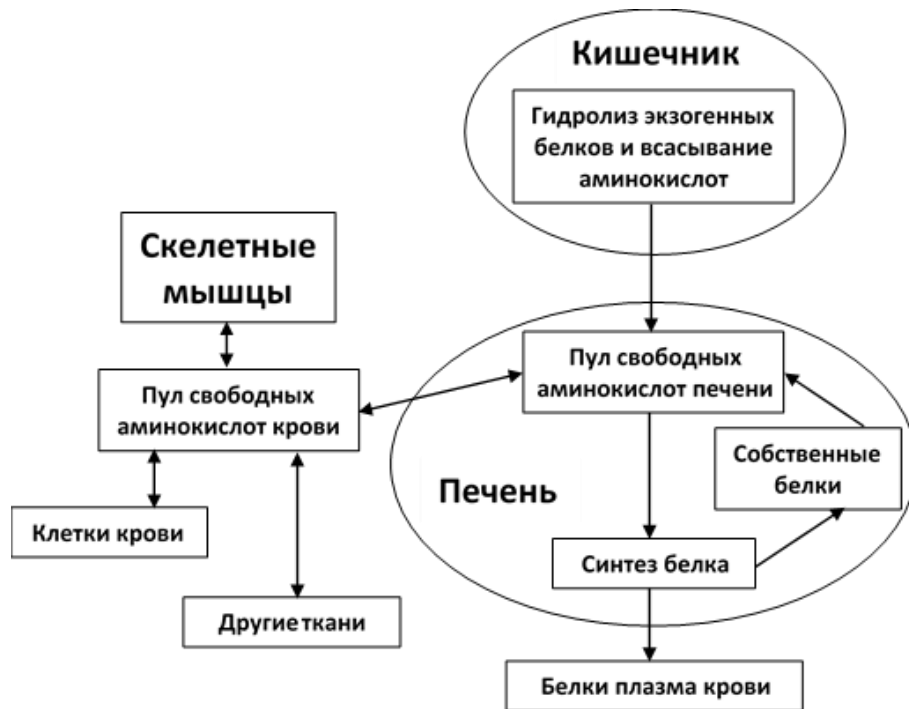


Рис. 1. Обмен аминокислот между печенью и другими тканями после их абсорбции в кишечнике [1]

Из данной схемы следует, что формирование фонда свободных аминокислот плазмы крови и тканей организма зависит от соотношения процессов биосинтеза белка в клетках и протеолиза в тканях, а также активности их транспорта через плазматические мембраны. Аминокислотный дисбаланс может носить адаптивный характер, но на практике это состояние характеризует патологические изменения, происходящие в пораженных органах или тканях. В качестве примера приведем структуру фонда свободных аминокислот печени здоровых белых крыс (нмоль/г) [2]: общее количество аминокислот и их производных 19178 ± 1079 ; общее количество протеиногенных аминокислот 12738 ± 637 ; общее количество заменимых аминокислот 10913 ± 592 ; общее количество незаменимых аминокислот 1825 ± 69 ; общее количество производных аминокислот 6440 ± 740 ; соотношение уровней протеиногенных/производных аминокислот $2,64 \pm 0,43$, а заменимых/незаменимых аминокислот $6,00 \pm 0,25$; общее количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ) 601 ± 29 ; общее количество серосодержащих аминокислот 5344 ± 797 . В спектр свободных аминокислот плазмы крови здоровых белых крыс входят (мкмоль/л) [3]: общее количество аминокислот и их азотсодержащих производных 3035 ± 154 ; общее количество протеиногенных аминокислот 2685 ± 128 ; общее количество азотсодержащих производных аминокислот 350 ± 27 ; общее количество заменимых аминокислот 1474 ± 107 ; общее количество АРУЦ 318 ± 23 ; общее количество серосодержащих аминокислот 254 ± 22 .

Анализ публикаций показывает, что по мере совершенствования методов оценки спектра свободных аминокислот (автоанализатор аминокислот AAA-339M [4; 5], аминокислотный анализатор Aracus [6], ВЭЖХ-система Waters [7], ВЭЖХ системы Agilent 1100/1200 [8; 9]) происходит определенная коррекция показателей нормы для свободных аминокислот тканей и биологических жидкостей.

Цель работы – оптимизировать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения свободных аминокислот с использованием оборудования компании Agilent.

Материал и методы. Забор биологического материала для исследования спектра свободных аминокислот требует соблюдения ряда условий. Животных забивают декапитацией с соблюдением этических правил работы с экспериментальными млекопитающими. За 12 ч до забоя животных лишают пищи. После забоя собирают кровь в гепаринизированные пробирки. Образцы тканей забирают в течение 3 мин после забоя животных и немедленно замораживают и хранят при -60°C .

Выделение плазмы крови, пробоподготовка образцов тканей и плазмы. Немедленно после забора крови осаждают форменные элементы центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин, отделяют плазму крови аспирацией. Время от момента отделения плазмы до замораживания или начала пробоподготовки составляет не более 15 мин во избежание завышения в пробах содержания глутамата, а также влияния распада глутамина.

Для *осаждения белков* образец плазмы крови смешивают с равным объемом 1 М раствора хлорной кислоты, содержащего 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, а также 0,2 мМ норвалина (nVal) (внутренний стандарт). После тщательного перемешивания пробы центрифугируют при 4 °С в течение 15 мин при 16000g, супернатант немедленно отсасывают и хранят до исследования при –18 °С (–60 °С при наличии низкотемпературного холодильника) не более 15 суток. После размораживания экстракты повторно центрифугируют, при выпадении осадка супернатант переносят в отдельные пробирки. Полученные хлорнокислые экстракты используют для хроматографических определений.

Образцы тканей гомогенизируют в соотношении 1:10 (по объему) в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты, 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, а также 0,2 мМ nVal (внутренний стандарт), со скоростью 400–600 об/мин. Образец ткани (20–100 мг) взвешивают, не допуская размораживания, заливают 10-кратным объемом среды и немедленно гомогенизируют. Далее образцы центрифугируют как экстракты плазмы крови, супернатанты немедленно отбирают аспирацией и хранят до исследования при –18 °С (–60 °С).

Растворы стандартов, использованные для калибровки хроматографического оборудования, обрабатывают аналогичным способом.

Определение свободных аминокислот и родственных соединений. Определение свободных аминокислот и их дериватов проводят в хлорнокислых экстрактах тканей и плазмы крови методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом (ОРА) и 3-меркаптопропионовой кислотой (3-МРА) и детектированием по флуоресценции (338/445 нм).

Используют сорбент Zorbax Eclipse Plus C_{18} с размером частиц 3,5 мкм, размеры колонки 2,1×150 мм, с предколонкой 2,1×12,5 мм, заполненной таким же сорбентом, размером частиц 5 мкм.

Предколоночную дериватизацию проводят непосредственно перед вводом проб в хроматограф. Вначале пробу (0,2 мкл) смешивают с 0,4М Na-боратным буфером pH 9,8 (2 мкл), затем после 3-кратного перемешивания добавляют ОРА-3-МРА-реагент, содержащий 0,4% ОРА и 0,4% 3-МРА в 0,4М Na-боратном буфере pH 9,8 (0,3 мкл) и вновь перемешивают 6 раз. Далее пробу нейтрализуют добавлением 4 мкл 2% уксусной кислоты и перемешивают 3 раза, после чего немедленно вводят в колонку. В процессе дериватизации игла автосамплера промывается водой перед добавлением ОРА-3-МРА-реагента, 70% метанолом – перед нейтрализацией и перед вводом пробы. Скорость перемешивания на всех этапах – 400 мкл/мин. Автосамплер термостатируют при 5 °С, процедура дериватизации осуществляется при этой температуре.

Для *оптимизации условий разделения* используют Na-ацетатную буферную систему, включающую: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,85, содержащий 20 мг/л ЭДТА (А); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (В), метанол/вода 7/3 (об/об) (С), 0,1 М раствор ацетата натрия, содержащий 20 мг/л ЭДТА (D). Растворы А и D содержат по 40 мг/л азида натрия в качестве консерванта.

Оптимизированные условия разделения включали градиентное элюирование сложным профилем от 3,5 до 100% В, с изменением соотношения В/С и А/D в ходе анализа, за 69,5 мин (полный цикл до начала дериватизации следующей пробы – 81,5 мин); температура колонки 35 °С. Процентное соотношение компонентов подвижной фазы (профиль градиента) приведено в табл.

Порядок элюирования определяемых соединений: цистеиновая кислота (CA), О-фосфосерин (PSer), цистеинсульфиновая кислота (CSA), аспарагиновая кислота (Asp), гомоцистеиновая кислота (HCA), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), α -аминоадипиновая кислота (α AAA), глутамин (Gln), гистидин (His), 3-метилгистидин (3MHis), глицин (Gly), фосфоэтанолламин (PEA), треонин (Thr), 1-метилгистидин (1MHis), цитруллин (Ctr), аргинин (Arg), ансерин (Ans), β -аланин (β Ala), гипотаурин (HrTau), аланин (Ala), таурин (Tau), β -аминоизомасляная кислота (β AlBA), γ -аминомасляная кислота (GABA), тирозин (Tyr), α -аминомасляная кислота (α ABA), этаноламин (EA), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), норвалин (nVal) – внутренний стандарт, триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), орнитин (Orn), лизин (Lys).

Профиль градиентного элюирования (процентное содержание компонентов подвижной фазы)

Время, мин	%A	%B	%C	%D
0	10,5	3,5	0,0	86,0
1,5	10,2	6,5	0,0	83,3
3	7,7	9,5	0,0	82,8
9	7,6	10,4	0,0	82,0
9,01	14,0	10,4	0,0	75,6
12,50	12,0	11,0	0,0	77,0
12,51	6,5	11,0	0,0	82,5
16	6,5	11,5	0,0	82,0
17	13,8	5,5	13,5	67,2
23	12,7	5,5	19,5	62,3
24	12,7	6,5	19,0	61,8
25	6,1	10,6	14,0	69,3
37	5,9	19,0	8,0	67,1
43	6,1	25,0	7,0	61,9
43,5	15,4	25,5	6,5	52,6
52,8	14,8	31,7	2,9	50,6
53	5,1	35,0	0,0	59,9
58	4,6	42,0	0,0	53,4
61	0,0	40,0	60,0	0,0
68	0,0	40,0	60,0	0,0
69,5	10,5	3,5	0,0	86,0

Определение цистина недостаточно надежно и требует детектирования по поглощению при длине волны 338 нм, так как производное цистина, как и других дисульфидов – производных серосодержащих аминокислот, практически не флуоресцирует при данных условиях. Поэтому от определения данного соединения часто отказываются из-за невозможности контролировать соотношение уровней окисленного и восстановленного компонентов пары цистин/цистеин в зависимости от редокс-потенциала системы. Это связано с тем, что цистеин способен легко образовывать смешанные дисульфиды с другими тиолами, в том числе сульфгидрильными группами белков до их осаждения при пробоподготовке.

Для калибровки системы используют концентрат стандартной смеси физиологических аминокислот (кислых, нейтральных и основных) Aldrich (США), в которую дополнительно вносят: цистеиновую кислоту (CA), цистеинсульфиновую кислоту (CSA), гомоцистеиновую кислоту (HCA), L-глутамин, L-аспарагин, O-фосфоэтанолламин.

Воспроизводимость метода (ОСКО) $\pm 2\%$, предел обнаружения по трехкратному превышению высоты пика над амплитудой высокочастотного шума – $2,5 \times 10^{-13}$ моль в пробе для цистеиновой и цистеинсульфиновой кислот. Эта последняя актуальная версия метода применяется с 2018 г. Ее наиболее близкий аналог описан в [10].

Оборудование и реактивы. При всех определениях, приведенных в данной статье, использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200 в конфигурации, включающей 4-канальную систему подачи растворителя G1311A с вакуумным дегазатором, термостатируемый автосамплер (ALS) G1329A, термостат колонок G1316A, детектор флуоресценции G1321C и диодно-матричный детектор G1315D. В опытах использовались реактивы для приготовления подвижных фаз квалификации не ниже «хч», стандарты определяемых соединений Aldrich, трижды дистиллированная вода. При пробоподготовке применялась центрифуга Biofuge Primo R+ с охлаждаемым ротором (Thermo Scientific, США).

Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent Open Lab CDS C.01.05 с ручной коррекцией базовой линии, в режиме расчета по внутреннему стандарту с использованием одноуровневой калибровки.

Цифровой материал обрабатывали методами параметрической и непараметрической вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение. Приведем три варианта хроматограмм свободных аминокислот плазмы крови и ткани печени. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот представлена на рис. 2, для плазмы крови – на рис. 3 и для печени – на рис. 4.

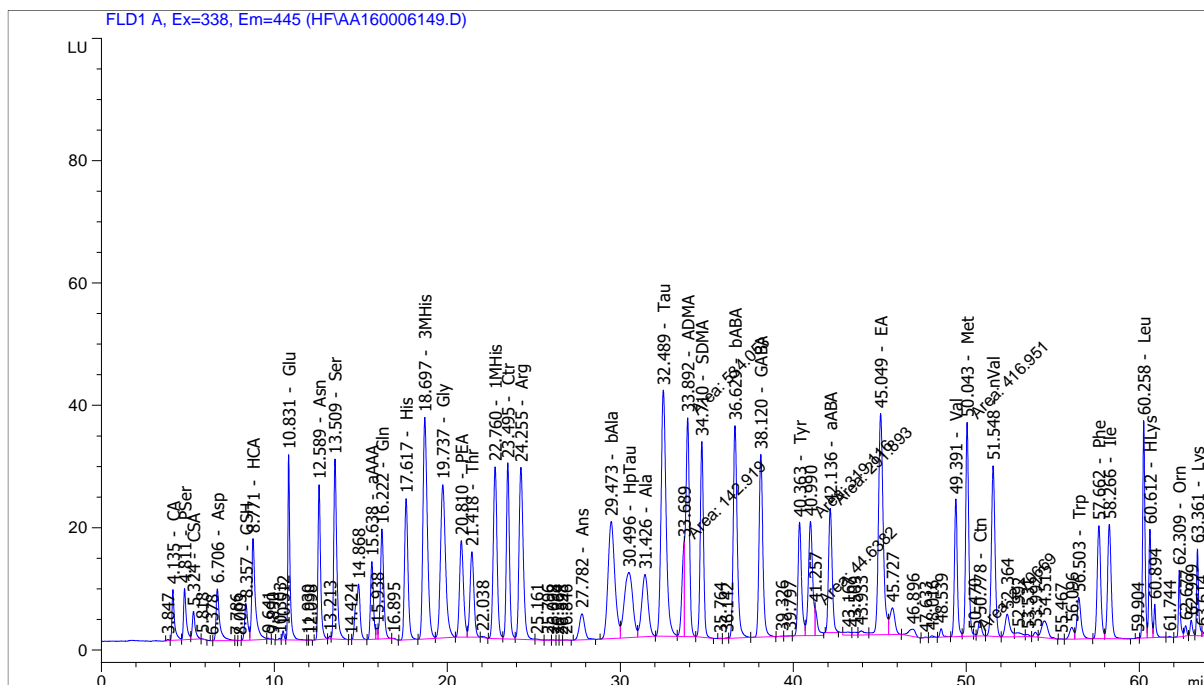


Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот и их производных для плазмы крови при разделении их оптимизированным методом обращенно-фазной хроматографии. Каждый пик соответствует концентрации 463 мкМ соединения

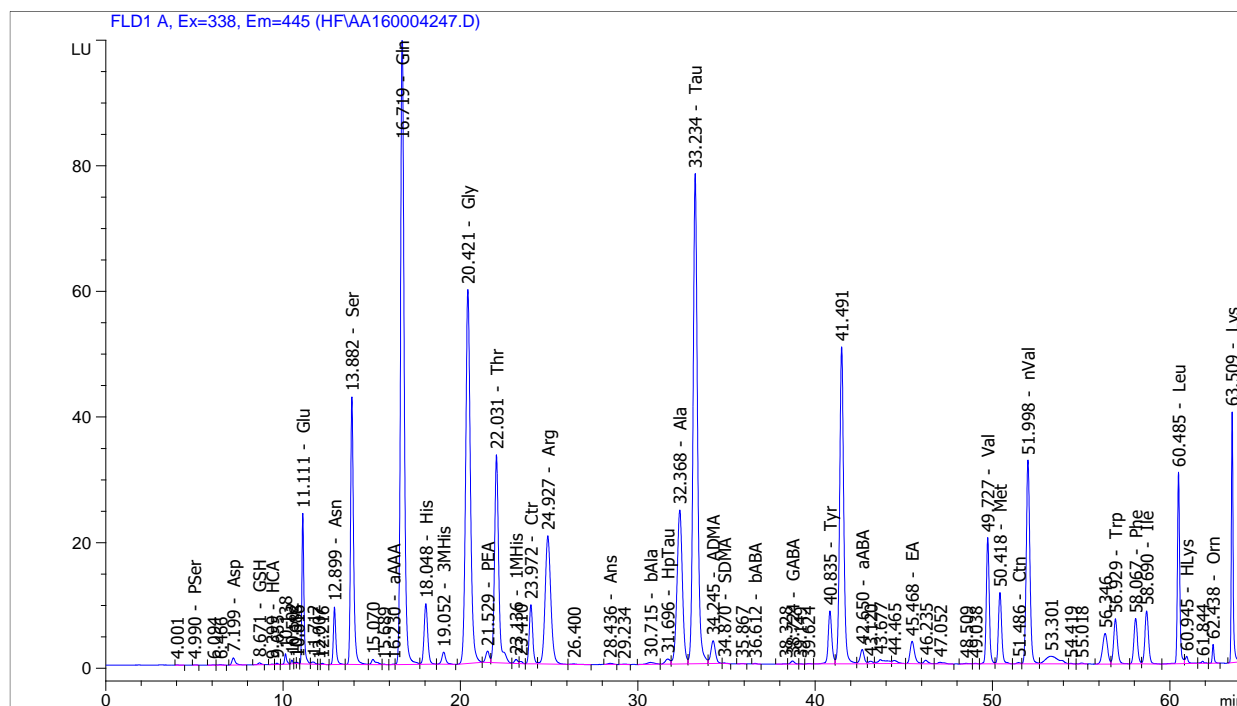


Рис. 3. Хроматограмма свободных аминокислот и их производных плазмы крови при разделении их оптимизированным методом

В плазме крови здоровых людей выявляется до 43 свободных аминокислот, их производных и некоторых других азотсодержащих соединений. В наибольших концентрациях присутствуют глутамин, аланин, лизин, валин, треонин, гистидин, глутаминовая кислота, тирозин, аргинин и др.

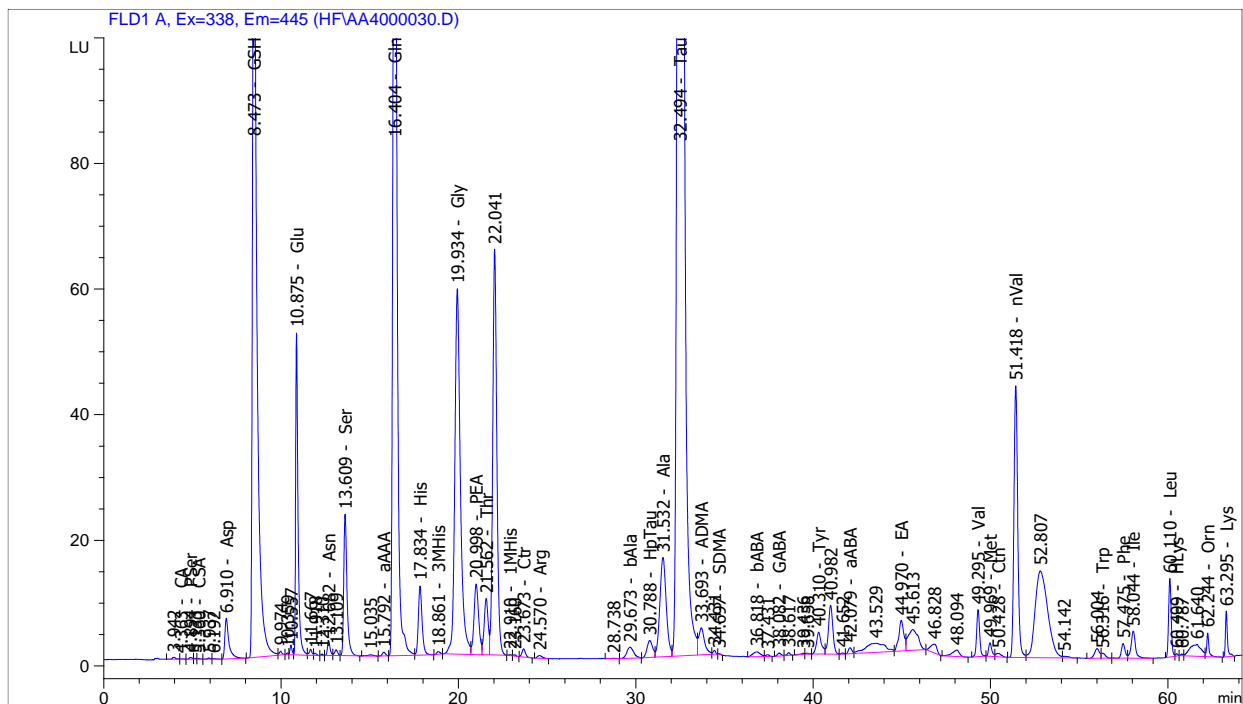


Рис. 4. Хроматограмма свободных аминокислот и их производных хлорнокислого экстракта ткани печени крысы

В результате анализа хлорнокислых экстрактов ткани печени крысы были обнаружены также 43 свободные аминокислоты, их производные и ряд других азотсодержащих соединений, в том числе таурин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, треонин, серин, гистидин, валин, тирозин, триптофан, фенилаланин, изолейцин, орнитин и др.

Заключение. С помощью представленного метода удастся определять до 43 свободных аминокислот и их производных, что существенно повышает информативность исследований обмена и транспорта аминокислот в биологических объектах.

ЛИТЕРАТУРА

- Шейбак, В.М. Свободные аминокислоты печени после внутрижелудочного введения животным инфезола 40 / В.М. Шейбак [и др.] // *Hepatology and Gastroenterology*. – 2017. – № 2. – С. 158–163.
- Шейбак, В.М. Свободные аминокислоты в ткани печени крыс после введения тритарга / В.М. Шейбак [и др.] // *Журнал ГрГМУ*. – 2018. – № 5. – С. 585–589.
- Шейбак, В.М. Влияние композиции «Тритарг» на концентрацию свободных аминокислот в лимфоцитах и сыворотке крови крыс / В.М. Шейбак [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук*. – 2012. – № 1. – С. 85–89.
- Дорошенко, Е.М. Влияние смеси аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, таурина и триптофана на структуру печени и фонд свободных аминокислот у крыс при субхронической алкогольной интоксикации и синдроме отмены этанола / Е.М. Дорошенко [и др.] // *Новости науки и техники. Сер.: Медицина. Алкогольная болезнь*. – 2001. – № 12. – С. 4–10.
- Артемова, О.В. Свободные аминокислоты печени крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации / О.В. Артемова, В.В. Лелевич // *Журнал ГрГМУ*. – 2007. – № 3. – С. 25–28.
- Черных, А.А. Метаболизм ароматических аминокислот при выраженной острой кратковременной экспериментальной нормобарической гипоксии у человека / А.А. Черных // *Экология человека*. – 2013. – № 07. – С. 59–63.
- Лелевич, В.В. Коррекция метаболических нарушений композициями аминокислот при прерывистой алкогольной интоксикации / В.В. Лелевич, С.В. Лелевич // *Вес. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук*. – 2017. – № 3. – С. 22–28.
- Шейбак, В.М. Влияние тритарга на спектр протеиногенных аминокислот в сыворотке крови и лимфоцитах / В.М. Шейбак, А.Ю. Павлюковец, М.В. Горецкая, Е.М. Дорошенко // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2011. – № 9. – С. 32–34.
- Дорошенко, Е.М. Анализ аминокислот и родственных соединений хроматографическими методами / Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирнов // *В кн.: Современные проблемы биохимии. Методы исследований / под ред. проф. А.А. Чиркина*. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – С. 104–132.
- Дорошенко, Е.М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е.М. Дорошенко, В.А. Снежицкий, В.В. Лелевич // *Журнал Гродн. гос. мед. ун-та*. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551–556.

REFERENCES

1. Sheybak V.M. Hepatology and Gastroenterology, 2017, 2, pp. 158–163.
2. Sheybak V.M. *Zhurnal GrGMU* [Journal of GrSMU], 2018, 5, pp. 585–589.
3. Sheybak V.M. *Vestsi Natsiyanalnay akademii navuk Belarusi. Ser. med. navuk* [Journal of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Sciences], 2012, 1, pp. 85–89.
4. Doroshenko Ye.M. *Novosti nauki i tekhniki. Ser.: Meditsina. Alkogolnaya bolezn* [News of Science and Technology. Medicine. Alcohol Abuse], 2001, 12, pp. 4–10.
5. Artemova O.V., Lelevich V.V. *Zhurnal GrGMU* [Journal of GrSMU], 2007, 3, pp. 25–28.
6. Chernykh A.A. *Ekologiya cheloveka* [Ecology of the Man], 2013, 7, pp. 59–63.
7. Lelevich V.V., Lelevich S.V. *Vestsi Natsiyanalnay akademii navuk Belarusi. Ser. med. navuk* [Journal of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Sciences], 2017, 3, pp. 22–28.
8. Sheybak V.M., Pavlyukovets A.Yu., Goretskaya M.V., Doroshenko Ye.M. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2011, 9, pp. 32–34.
9. Doroshenko Ye.M., Smirnov V.Yu. *Sovremenniye problemy biokhimii. Metody issledovaniy* [Modern Issues of Biochemistry. Research Methods], Minsk: Vysheyschaya shkola, 2013, pp. 104–132.
10. Doroshenko Ye.M., Snezhitski V.A., Lelevich V.V. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Grodno State Medical University], 2017, 15(5), pp. 551–556.

Поступила в редакцию 11.04.2022

Адрес для корреспонденции: e-mail: dgi03@mail.ru – Дорошенко Е.М.