

УДК 543.544.5.068.7; 615.21

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Попов Н.С., Колгина Н.Ю., Петров Г.А., Сивас И.С., Ильницкая И.Ю., Абалихина И.Д., Куликова В.С.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ

В настоящем исследовании разработана методика количественного определения свободных аминокислот в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Хроматографию выполняли с использованием аналитической колонки Zorbax Eclipse AAA 4,6×150 мм, 3,5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь деионизированной воды и ацетонитрила с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме. Детектирование аминокислот проводили в режиме мониторинга множественных реакций. Нижний предел количественного определения аминокислот в плазме крови составил 1 нмоль/мл. Разработанная методика характеризуется простой пробоподготовкой, достаточной чувствительностью и селективностью без применения сложных и длительных процедур дериватизации, малым временем анализа и применением универсальных элюентов.

Ключевые слова: аминокислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, метаболомика

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN BLOOD PLASMA BY HPLC-MS/MS

Popov N.S., Kolgina N.Yu., Petrov G.A., Sivas I.S., Ilitskaya I.Yu., Abalikhina I.D., Kulikova V.S.

Tver State Medical University

In the present study, a method for the quantitative determination of free amino acids in blood plasma using HPLC-MS/MS was developed. Chromatography was performed using a Zorbax Eclipse AAA 4.6×150 mm, 3.5 μm analytical column. The mobile phase was a mixture of deionized water and acetonitrile with the addition of 0.1% formic acid in a gradient mode. Amino acids were detected in the multiple reaction monitoring mode. The lower limit of quantitative determination of amino acids in blood plasma was 1 nmol/ml. The developed technique is characterized by simple sample preparation, sufficient sensitivity and selectivity without the use of complex and lengthy derivatization procedures, short analysis time, and the use of universal eluents.

Keywords: amino acids, high performance liquid chromatography, mass-spectrometry, metabolomics

**Введение.** Количественное определение свободных аминокислот в биологических жидкостях имеет важное значение в диагностике и лечении нарушения обмена веществ, включая первичные аминоацидопатии (например, фенилкетонурию, болезнь «кленового сиропа»), нарушения транспорта аминокислот (например, цистинурия), а также при оценке качества питания, соблюдения диеты, функционирования почек и повреждения тканей [7, 9, 11]. В более широком смысле анализ аминокислот является важным аналитическим инструментом в метаболомных исследованиях *in vivo* и *in vitro*, результаты которых имеют важное значение в медицине и фармации [3, 7].

Широко используемые хроматографические методы анализа аминокислот часто включают предколоночную и постколоночную дериватизацию. В качестве дериватирующих агентов часто используется нингидрин [4], данный метод характеризуется простой пробоподготовкой, имеет хорошую линейность, низкий матричный эффект и полное разделение производных аминокислот [7]. Несмотря на высокую производительность, этот метод характеризуется большой продолжительностью анализа, а также использованием дорогостоящих реагентов и буферных растворов. Предколоночная дериватизация аминокислот с *o*-фталевым альдегидом или 9-флуоренилметилхлорформиатом [1, 4, 5, 6, 10] с последующим разделением в обращенно-фазовом режиме обеспечивает высокую

чувствительность и сокращение времени анализа, но требует проведения сложной пробоподготовки. Кроме того, этот подход обычно используется для анализа мочи, представляющей собой относительно простую биологическую матрицу. Вышеперечисленные методы характеризуются относительно низкой селективностью при использовании спектрофотометрического детектирования [2, 7].

Использование тандемной масс-спектрометрии для детектирования аминокислот при проведении хроматографического анализа (ВЭЖХ-МС/МС) с применением дериватизации и без нее характеризуется высокой селективностью и относительным сокращением времени анализа.

**Цель исследования:** разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения свободных аминокислот в плазме крови.

#### **Материалы и методы:**

Количественное определение аминокислот в плазме крови пациентов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. В качестве аналитического стандарта использовали комбинированный раствор 16 аминокислот (аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, тирозин, пролин, аргинин, гистидин, цистин, фенилаланин, лизин, метионин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота.) с индивидуальной концентрацией каждой аминокислоты 1 мкмоль/мл (Agilent Technologies). Полученный раствор разводили 0,1 н водным раствором хлористоводородной кислоты для получения калибровочных растворов с индивидуальной концентрацией каждой аминокислоты 1, 5, 10, 50, 100 нмоль/мл. Кроме того, дополнительно готовили комбинированный раствор, содержащий аспарагин, гидроксипролин, глутамин и триптофан в концентрации 1 мкмоль/мл путем растворения точной навески аминокислот (Agilent Technologies) в 0,1 н растворе хлористоводородной кислоты. Из полученного раствора готовили калибровочные растворы с вышеперечисленными концентрациями. Для хроматографического анализа применяли ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия), в качестве неподвижной фазы использовали обращенно-фазовую колонку Zorbax Eclipse AAA 4,6×150 мм, 3,5 мкм, элюирование осуществляли смесью ацетонитрила и воды в градиентном режиме.

Для детектирования аминокислот при проведении хроматографического анализа применяли тандемный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур). Подбор условий детектирования осуществляли путем прямого ввода в масс-спектрометр индивидуальных растворов аминокислот в ацетонитриле с концентрацией 500 пмоль/мл. На первом этапе для каждого аналита определяли  $m/z$  протонированных молекул при положительной ионизации, подбирали оптимальные значения декластеризующего потенциала и потенциала на входе в ячейку соударений. На втором этапе для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектр второго порядка, выбирали характеристический ион-продукт, для которого подбирали оптимальные значения энергии соударений и потенциала на выходе из ячейки соударений. Полученные данные обеспечивали наилучшую селективность и чувствительность при детекции аналитов в режиме мониторинга множественных реакций.

Обработку первичных данных масс-спектрометрии и хроматографического анализа осуществляли с помощью программного обеспечения Sciex Analyst 1.3.6, статистический анализ результатов проводили с использованием Microsoft Office Excel 365.

На этапе разработки методики подбирали оптимальные условия пробоподготовки плазмы крови, обеспечивающие наилучшую степень извлечения и минимальный матричный эффект.

Обработку первичных данных масс-спектрометрии и хроматографического анализа осуществляли с помощью программного обеспечения Sciex Analyst 1.3.6, статистический анализ результатов проводили с использованием Microsoft Office Excel 365.

#### **Результаты и обсуждение.**

В качестве неподвижной фазы при проведении хроматографического анализа

аминокислот использовали обращенно-фазовую колонку Zorbax Eclipse AAA 4,6×150 мм, 3,5 мкм при температуре 40°C. Хроматографию проводили в градиентном режиме: 0 - 2 мин – смесь ацетонитрила и воды деионизированной в соотношении 5:95 с добавлением 0,1% муравьиной кислоты; 2-6 мин – увеличение концентрации ацетонитрила до 70%, 6 - 7 мин – фаза плато (70% ацетонитрил), 7 - 10 минут – ацетонитрил и вода деионизированная в соотношении 5:95. Скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин; объем вводимой пробы – 10 мкл; общее время градиентного элюирования – 10 минут (таблица 1).

Таблица 1 Хроматографические параметры определения аминокислот в плазме крови

Колонка	Zorbax Eclipse AAA 4,6×150 мм, 3,5 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 0,1% муравьиной кислоты			
Элюент В	Ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мкл/мин	% А	% В
	0,0		95	5
	2,0		95	5
	6,0		30	70
	7,0		30	70
	7,01 10,0		95 95	5 5
Температура колонки, °С	40			
Аликвота, мкл	10			
Общее время анализа, мин	10			
Промывка инжектора	5 секунд, 50% водный раствор ацетонитрила			

Детектирование аналитов осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций на основании регистрации соответствующих MRM-переходов. Параметры детектирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 Параметры масс-спектрометрического детектирования аминокислот

Тип источника ионов		TurboIonSpray					
Режим ионизации		Положительный					
Температура источника ионов, °С		400,0					
Напряжение источника ионов, В		5500,0					
Давление газа завесы, psi		20,0					
Давление газа-распылителя, psi		35,0					
Давление газа-нагревателя, psi		45,0					
Аминокислота	MRM, <i>m/z</i>	Dwell, мсек	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
L-аспарагиновая кислота	134,1/74,1	100	54	10,0	30	40	2,2
L-аланин	90,1/44,0		35		11	18	2,0
L-валин	118,1/55,0		28		10	26	2,4
L-лейцин, L-изолейцин	132,1/86,1		43		10	12	2,0
L-серин	106,1/60,0		18		9	20	2,0
L-треонин	120,1/103,2		30		18	22	2,0
L-тирозин	182,2/165,2		27		13	14	2,6
L-пролин	116,1/70,0		17		12	20	2,6
L-аргинин	175,2/70		54		13	35	2,0
L-гистидин	156,1/110,0		48		12	17	2,2
L-глутаминовая кислота	148,1/84,0		16		10	13	2,0
Цистин	241,2/152,1		41		12	15	2,0
L-фенилаланин	166,1/103		25		11	34	2,1

L-лизин	147,1/84,0	18	10	20	2,0
L-метионин	150,2/104,0	19	10	12	2,8
L-аспарагин	133,1-74,1	18	19	10	3,0
L-4- гидроксипролин	132,1/68,1	15	19	25	4,2
L-глутамин	147,1/84,1	16	19	20	3,0
L-триптофан	205,3/145,9	41	26	22	2,1

Методика пробоподготовки образцов плазмы пациентов включала осаждение белков 3% водным раствором сульфосалициловой кислоты. Для этого в пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл к 200 мкл плазмы добавляли 200 мкл осаждающего раствора, перемешивали на вортексе 30 секунд, выдерживали при температуре 4°C в течение 15 минут, после чего центрифугировали при 15 000 об/мин 10 минут. Супернатант переносили в хроматографические виалы и использовали для анализа. Концентрацию аминокислот в анализируемых пробах определяли на основе калибровочной зависимости, установленной по результатам анализа серии стандартных растворов. Калибровочные кривые отражали зависимость площади пика аминокислоты от концентрации аналита в стандартном образце. Для калибровочных зависимостей были установлены уравнения линейной регрессии при значениях коэффициента корреляции не ниже 0,99 (таблица 3).

Общая хроматограмма плазмы крови представлена на рисунке 1, время удерживания каждой аминокислоты представлено в таблице 3.

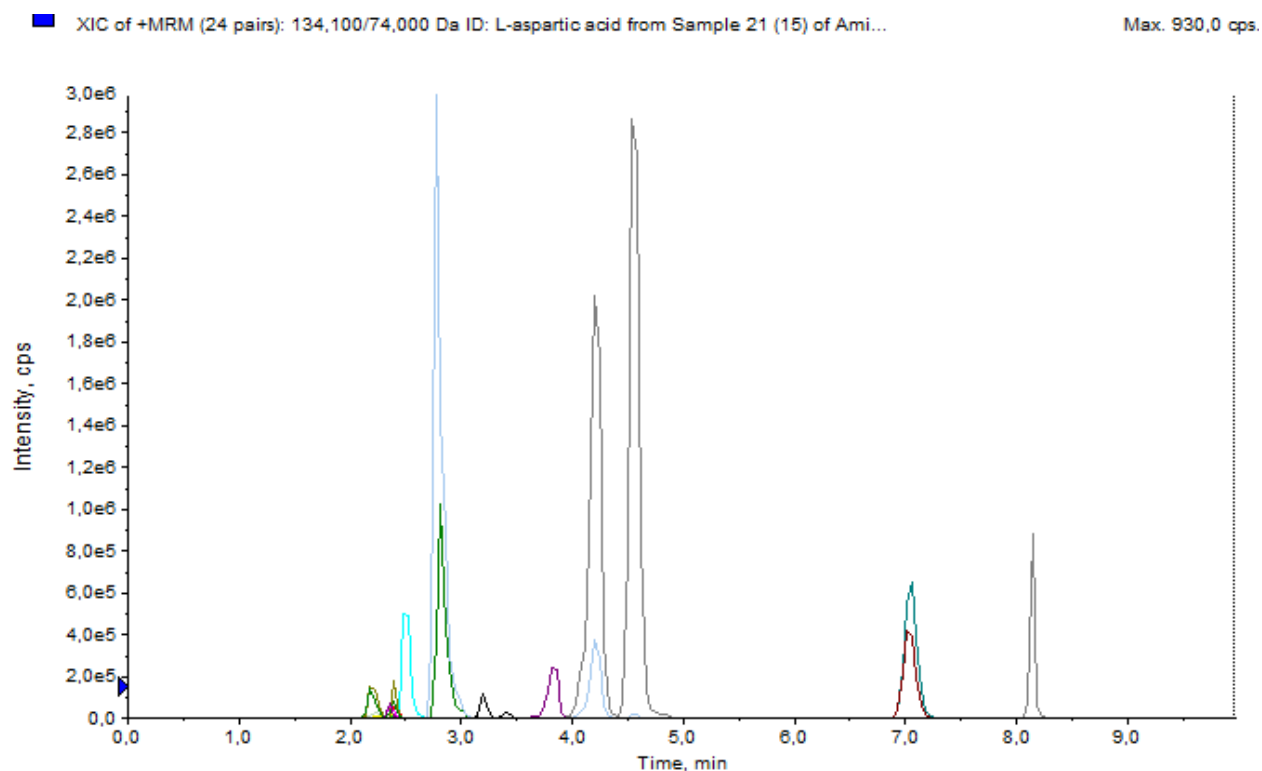


Рис. 1. Общая хроматограмма образца плазмы крови при анализе свободных аминокислот. Таблица 3 Параметры методики хроматографического определения аминокислот в плазме крови

Аминокислота	Время удерживания, мин	Аналитический диапазон, нмоль/мл	Уравнение регрессии	r <sup>2</sup>
L-аспарагиновая кислота	2,35	1,0 – 100,0	y=19200x+50900	0,9987
L-аланин	2,35	1,0 – 100,0	y=15100x+7250	0,9999
L-валин	2,86	5,0 – 100,0	y=60000x+13700	0,9997

L-лейцин, L-изолейцин	3,70; 4,15	1,0 – 50,0	$y=897000x+267000$	0,9968
L-серин	2,32	1,0 – 50,0	$y=18700x+14800$	0,9986
L-треонин	6,66	1,0 – 100,0	$y=215000x+90600$	0,9991
L-тирозин	3,29	1,0 – 100,0	$y=59500x+67100$	0,9969
L-пролин	2,52	1,0 – 100,0	$y=36100x+81500$	0,9935
L-аргинин	2,23	1,0 – 50,0	$y=139000x+27900$	0,9984
L-гистидин	2,20	1,0 – 50,0	$y=202000x+173000$	0,9969
L-глутаминовая кислота	2,43	1,0 – 100,0	$y=11900x+4600$	0,9986
Цистин	2,28	1,0 – 50,0	$y=82100x+19200$	0,9974
L-фенилаланин	6,64	1,0 – 100,0	$y=1480000x+1270000$	0,9985
L-лизин	2,19	1,0 – 50,0	$y=1710000x+365000$	0,9988
L-метионин	3,15	1,0 – 50,0	$y=91400x+34700$	0,9988
L-аспарагин	2,31	1,0 – 100,0	$y=8410x+2280$	0,9996
L-4-гидроксипролин	3,99	1,0 – 50,0	$y=7560x+2240$	0,9964
L-глутамин	2,18	1,0 – 50,0	$y=154000x+24900$	0,9993
L-триптофан	8,15	1,0 – 100,0	$y=1360000x+1150000$	0,9986

Для разработанной методики количественного определения аминокислот в плазме крови были установлены метрологические характеристики. Нижний предел количественного определения составил 1 нмоль/мл, при этом соотношение «сигнал-шум» на хроматограмме установлено не ниже 12:1, а отклонение от номинальной концентрации не превышало 15%. Установлен аналитический диапазон методики, показано, что пропорциональное возрастание площади хроматографического пика в зависимости от концентрации наблюдалось от 1 нмоль/мл до 50 или 100 нмоль/мл в зависимости от определяемой аминокислоты. Коэффициент корреляции для линейной зависимости составил не менее 0,99. Кроме того, был валидирован фактор разбавления плазмы крови деионизированной водой. Отклонения концентрации аминокислот от номинальной после разбавления не превышали 15%.

#### **Заключение.**

Таким образом, разработанная методика определения аминокислот в плазме крови характеризуется простой пробоподготовкой, достаточной чувствительностью и селективностью без применения сложных и длительных процедур дериватизации, малым временем анализа и применением универсальных элюентов. Это позволяет широко использовать данную методику в работе клинико-диагностических лабораторий.

1. Попов Н. С. и др. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного анализа нейроактивных аминокислот в гомогенатах головного мозга крыс после дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформиадом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24. – №. 10. – С. 45-51.
2. Eid S. M., Farag M. A., Bawazeer S. Underivatized Amino Acid Chromatographic Separation: Optimized Conditions for HPLC-UV Simultaneous Quantification of Isoleucine, Leucine, Lysine, Threonine, Histidine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan, and Tyrosine in Dietary Supplements // ACS omega. – 2022. – Т. 7. – №. 35. – С. 31106-31114.
3. Giordano G. et al. Quantification of underivatized amino acids on dry blood spot, plasma, and urine by HPLC-ESI-MS/MS // Amino Acid Analysis: Methods and Protocols. – 2012. – С. 219-242.
4. Harder U., Koletzko B., Peissner W. Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC-MS/MS // Journal of Chromatography B. – 2011. – Т. 879. – №. 7-8. – С. 495-504.
5. Hill D. et al. Quantitative HPLC analysis of plasma amino acids as orthophthaldialdehyde/ethanethiol derivatives // Journal of Liquid Chromatography. – 1982. – Т. 5. – №. 12. – С. 2369-2393.

6. Johnson D. W. Free amino acid quantification by LC–MS/MS using derivatization generated isotope-labelled standards //Journal of Chromatography B. – 2011. – Т. 879. – №. 17-18. – С. 1345-1352.
7. Le A. et al. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) //Journal of Chromatography B. – 2014. – Т. 944. – С. 166-174.
8. Liu Z. et al. A reliable LC-MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: method validation and application to a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression //Journal of Chromatography B. – 2019. – Т. 1124. – С. 72-81.
9. Sharma G. et al. Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory //Amino Acids. – 2014. – Т. 46. – С. 1253-1263.
10. Soma Y. et al. In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid Quantification (iPDAQ) Using HPLC //Metabolites. – 2022. – Т. 12. – №. 9. – С. 807.
11. Waterval W. A. H. et al. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism //Clinica chimica acta. – 2009. – Т. 407. – №. 1-2. – С. 36-42.