

УДК 543.545

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КАРБОНОВЫХ И АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ЭНДОМЕТРИОЗ МЕТОДАМИ ЖИДКОСТНОЙ (ВЭЖХ-УФ) И ГАЗОВОЙ (ГХ-МС) ХРОМАТОГРАФИИ

© 2023 г. Е. А. Бессонова^{а, *}, А. Т. Арасланова^а, А. И. Лазаретова^а,
И. Е. Говоров^б, С. И. Ситкин^б, Л. А. Карцова^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России
ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, 197341 Россия

*e-mail: Lena_pol@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 28.05.2023 г.

Принята к публикации 28.05.2023 г.

Предложены подходы к высокочувствительному определению низкомолекулярных жирных кислот методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и аминокислот методом ВЭЖХ с применением диодно-матричного детектора в образцах сыворотки крови больных с диагнозом эндометриоз. Найдены условия селективного определения 23 аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в виде производных с дансилхлоридом и выявлены основные факторы, влияющие на параметры их разделения (рН подвижной фазы, природа растворителя и буферного раствора, профиль градиентного режима). Показано, что традиционное ГХ-определение метаболитов в форме силильных производных не обеспечивает требуемой чувствительности: высокая летучесть производных уже на стадии пробоподготовки приводит к значительным потерям и, как следствие, к невозпроизводимым результатам. Оптимизированы условия определения органических кислот без дериватизации методом ГХ-МС на полярной неподвижной фазе. Предложена схема подготовки сыворотки крови к анализу (осаждение белков и очистка от липидов) и условия селективного разделения аналитов (температурный градиент 70–230°C). Разработанные подходы обеспечили получение характеристических профилей органических кислот в образцах сыворотки крови больных с эндометриозом и миомой матки (в качестве группы сравнения).

Ключевые слова: метаболомика, аминокислоты, высоко- и низкомолекулярные жирные кислоты, ОФ ВЭЖХ, ГХ-МС, эндометриоз.

DOI: 10.31857/S0044450223100043, EDN: UZWRGF

Использование омик-технологий открывает перспективы для изучения метаболических процессов, происходящих при эндометриозе, — одном из самых распространенных заболеваний женской репродуктивной системы, точная этиология которого до сих пор неизвестна. Это обусловлено, в первую очередь, сложностью клинической картины и схожими симптомами с другими гинекологическими заболеваниями. По оценкам врачей, эндометриоз поражает 5–10% женщин репродуктивного возраста [1], при этом у некоторых женщин он может протекать бессимптомно и приводить к бесплодию. Несмотря на предпринятые попытки по разработке диагностических тестов на эндометриоз на основе метаболитов, содержащихся в биологических жидкостях, лишь

несколько зарегистрированных маркеров прошли независимую проверку [2, 3], и ни один из них пока не используется в клинической практике. В настоящее время диагностика эндометриоза проводится хирургическим методом — лапароскопией с последующей биопсией. Наиболее популярным биомаркером для неинвазивной диагностики эндометриоза является белок СА-125, однако отмечено, что он надежен лишь при диагностике на поздних стадиях заболевания. В связи с этим поиск потенциальных биомаркеров для ранней неинвазивной диагностики эндометриоза остается крайне актуальной задачей.

Метаболомику в настоящее время все чаще признают мощным инструментом для установления патогенеза и идентификации диагностиче-

ских биомаркеров, выявления низкомолекулярных метаболитов в различных биологических объектах. Для получения и исследования метаболомного профиля применяют такие высокочувствительные и информативные методы, как жидкостная и газовая хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС и ГХ-МС). Несмотря на интенсивность исследований метаболомного состава биологических объектов при эндометриозе, имеющаяся в литературе [2, 3] информация относительно биомаркеров эндометриоза, среди которых наиболее часто упоминаются карбоновые кислоты, аминокислоты, нуклеотиды и др., весьма противоречива и требует дальнейшего изучения.

Так, в результате метаболомного профилирования сыворотки крови и ткани эндометрия женщин с эндометриозом на ранних стадиях по сравнению со здоровыми женщинами методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) обнаружено изменение уровней концентраций пяти аминокислот (аланин, лизин, фенилаланин, лейцин и пролин) [4]. Исследование показало определенную корреляцию их содержаний в тканях и в сыворотках крови. Это подтверждает предположение о том, что катаболическое состояние, вызванное повреждениями при эндометриозе, приводит к повышенному распаду эндогенного белка и высвобождению свободных аминокислот в кровоток. Кроме того, выявлено, что именно группа таких маркеров имеет более надежный диагностический потенциал по сравнению с отдельными маркерами. Авторами отмечена высокая чувствительность и специфичность (100 и 83% соответственно) диагностики II стадии эндометриоза с использованием данных аминокислот. В более ранних исследованиях [5, 6] эти же авторы обнаружили повышение уровня аланина, лейцина, валина, треонина, лизина, а также понижение — изолейцина и аргинина у пациентов с эндометриозом в образцах сыворотки крови по сравнению с контрольной группой. Значительный вклад в различие между аминокислотными профилями вносит лизин, что связывают с повышенной катаболической активностью организма при окислительном стрессе: быстрое расходование глюкозы и ускорение метаболизма глюкогенных аминокислот. Методом ЯМР в работах [7, 8] при метаболомном профилировании мочи и сыворотки крови больных с эндометриозом на разных стадиях выявлено повышение уровня валина и соотношения лизин/аргинин в сыворотке крови, а также увеличение содержания валина и понижение лизина в моче по сравнению с контролем. Полученные методами обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ и жидкостной гидрофильной хроматографии метаболомные профили сывороток крови больных с минимальной или средней стадией эндометриоза выявили значительное повышение концентраций L-аргинина, L-тирозина, лейцина,

лизина и аспарагина [9]. Все это указывает на информативность данных о содержании конкретных аминокислот при эндометриозе, поэтому дальнейшие исследования в этом направлении весьма актуальны.

Другой важный аспект проблем клинической диагностики — появившаяся в последние годы информация о возможности использования качественного и количественного состава низко- и высокомолекулярных органических кислот в биологических жидкостях человека в качестве диагностического критерия при различных патологиях. Особое внимание привлекают метаболиты бактериального происхождения — низкомолекулярные жирные кислоты (НМЖК), продуцируемые кишечной микробиотой. Это — класс карбоновых кислот с короткими алкильными группами: от двух до шести атомов углерода [10]. Наличие и соотношение концентраций этих аналитов в организме тесно связаны с такими заболеваниями, как сердечно-сосудистые, ожирение и метаболомный синдром. В специальных экспериментах на мышцах обнаружено, что *n*-бутират снижает рост эндометриоидных поражений [11]. В связи с этим представляет интерес проведение целевого метаболомного исследования состава низко- и высокомолекулярных органических кислот в сыворотке крови при эндометриозе.

Газовую хроматографию в сочетании с полимеразной цепной реакцией [10], жидкостную хроматографию в сочетании тандемной масс-спектрометрией [12], ГХ-МС [13, 14], ГХ с пламенно-ионизационным детектированием [15] и методы твердофазной микроэкстракции с последующим ГХ-МС-анализом [16] применяли либо для прямого определения НМЖК в сыворотке крови, либо после дериватизации. Процедуры подготовки пробы перед ГХ-МС-анализом обычно включают экстракцию растворителем, разделение фаз, выпаривание, получение сложных эфиров при нагревании и добавление внутренних стандартов [17, 18]. Однако некоторые из этих этапов пробоподготовки могут влиять на результаты определения НМЖК. Данные аналиты представляют собой достаточно летучие вещества [19], поэтому пробоподготовка следует проводить быстро; кроме того, возможны потери НМЖК на некоторых стадиях (например, при выпаривании растворителя или в реакциях, которые идут с нагреванием). Таким образом, поиск грамотной стратегии пробоподготовки и последующего определения НМЖК методом ГХ-МС является важной задачей для метаболомики.

Цель данного исследования — получение и изучение характеристических профилей аминокислот и короткоцепочечных алифатических кислот в сыворотке крови больных эндометриозом и миомой матки с применением хромато-масс-спек-

трометрии для оценки их диагностической значимости для данного заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реактивы. Использовали деионизованную воду (получали на деионизаторе “АКВИЛОН Д 301”, Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ (Acros Organics, Бельгия), метанол для ВЭЖХ (Acros Organics, Бельгия), этанол ос. ч. (Реахим, Россия), муравьиную кислоту х. ч. (Неохим, Россия), борную кислоту (Sigma-Aldrich, Германия), гидроксид натрия ч. д. а., дансилхлорид (Sigma-Aldrich, США), хлорную кислоту 70%-ую, х. ч. (Неохим, Россия), пиридин х. ч. (Реахим, Россия), N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (Sigma-Aldrich, Германия), O-метоксиамин х. ч. (Реахим, Россия), диэтиловый эфир, этилацетат, метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ), хлороформ х. ч. (Реахим, Россия). Аминокислоты: L-гистидин (His), L-аргинин (Arg), L-аспарагиновая кислота (Asp), L-глутамин (Gln), L-серин (Ser), L-глутаминовая кислота (Glu), L-глицин (Gly), L-аланин (Ala), L-пролин (Pro), L-изолейцин (Ile), DL-лейцин (Leu), L-норлейцин (NLeu), L-аланин (Ala), L-валин (Val), L-метионин (Met), L-триптофан (Trp), L-аспарагин (Asn), L-тирозин (Tyr), DL-лизин гидрохлорид (Lys), L-фенилаланин (Phe), L-цистеин (Cys), L-гомоцистеин, L-сарказин (Sarc) (>98%, Sigma-Aldrich, Германия). Органические кислоты: уксусная, пропионовая, масляная, изомаляновая, валериановая, изовалериановая, гексановая, гептановая, октановая, пивалевая х. ч. (Реахим, Россия).

Оборудование. Хроматографическое определение аминокислот выполняли на жидкостном хроматографе LC-40 Nexera (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором, колонка Luna C18(2), 5 мкм, 100 Å, 150 × 2.1 мм (Phenomenex, США). Органические кислоты определяли на газовом хроматографе с квадрупольным масс-детектором с электронной ионизацией пробы GCMS-QP2010 SE (Shimadzu, Япония). Капиллярные колонки для ГХ-МС: WAXplus 30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм (ОРТИМА), HP-5 (с неподвижной фазой 5% фенил 95% диметилполисилоксан) 30 м × 0.320 мм × 0.25 мкм (Agilent Technologies, США) и Zebron ZB FFAP (неподвижная фаза полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталатом) 50 м × 0.32 мм × 0.50 мкм (Phenomenex, США). Для обработки результатов анализа использовали программное обеспечение “LCsolution”. Вспомогательное оборудование: вортекс Multi-Vortex V-32, лабораторный pH-метр HI 2210–2216 pH 211 (Hanna, Германия), аналитические весы AUX 220 (Shimadzu, Япония), дозаторы 2–20, 20–200, 100–1000 мкл (Sartorius, Финляндия), шкаф сушильный LF 25/350-VS2 (LOIP, Россия), центри-

фуга Centrifuge 5430 (Eppendorf, Германия), ультразвуковая ванна (Elmasonic, Германия).

Приготовление рабочих растворов аминокислот и низкомолекулярных органических кислот. Концентрированные растворы стандартов аминокислот готовили растворением навесок каждой аминокислоты (10 ± 0.1 мг) в 1 мл 0.1 М соляной кислоты. Полученные растворы хранили при +4°C в течение месяца. Растворы стандартов органических кислот готовили растворением навесок каждой кислоты (10 ± 0.1 мг) в 1 мл метанола. Полученные растворы хранили при +4°C в течение месяца. Растворы модельных смесей различных концентраций для построения градуировочных зависимостей готовили путем разбавления исходных растворов стандартов непосредственно перед проведением дериватизации и последующим анализом методом ВЭЖХ-УФ или ГХ-МС.

Градуировочные растворы готовили для двух уровней концентраций, исходя из содержания аналитов в сыворотке: высокий уровень для аргинина, аспарагина, глутамина, серина, глутаминовой кислоты, аланина, глицина, пролина, валина и лизина – диапазон концентраций 10–100 мкг/мл; низкий уровень для гистидина, аспарагиновой кислоты, изолейцина, лейцина, метионина, триптофана, тирозина, фенилаланина, цистеина, гомоцистеина, сарказина – 0.5–50 мкг/мл. Градуировку проводили по семи точкам. На высоком уровне растворы с концентрациями 10, 20, 35, 50, 65, 80 и 100 мкг/мл готовили добавлением к 90 мкл сыворотки 10 мкл водного раствора смеси стандартов с концентрациями 100, 200, 350, 500, 650, 800 и 1000 мкг/мл соответственно. На низком уровне растворы с концентрациями 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 и 50 мкг/мл готовили аналогично из растворов с концентрациями 5, 10, 25, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл соответственно. Холостой раствор готовили путем прибавления к 90 мкл сыворотки 10 мкл деионизованной воды.

Объекты исследования. Образцы сывороток крови больных с диагнозом эндометриоз ($n = 30$) и миома матки ($n = 30$), предоставленные НМИЦ им. В.А. Алмазова, хранили в морозильной камере при –20°C. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре, перемешивали на вортексе в течение 1 мин.

Пробоподготовка сыворотки крови к ВЭЖХ и ГХ-МС-анализу. Аминокислоты. Подготовка проб сыворотки крови к анализу и дериватизация аминокислот включала следующие этапы: к 100 мкл пробы добавляли 100 мкл 5%-ного раствора (800 мМ) хлорной кислоты, перемешивали на вортексе (3 мин), центрифугировали (13 тыс. об./мин, 10 мин) и отбирали 150 мкл супернатанта. Для нейтрализации хлорной кислоты добавляли 6 мкл 10 М раствора NaOH. Далее к полученному раствору добавляли 20 мкл раствора норлейцина с

концентрацией 5 мкг/мл (внутренний стандарт) и 280 мкл 0.2 М боратного буферного раствора с рН 9.5, и затем – 100 мкл раствора дансилхлорида (7 мг/мл в ацетонитриле). Реакционную смесь перемешивали и помещали в термостат на 15 мин при 75°C, после чего добавляли 20 мкл ледяной уксусной кислоты. Пробы центрифугировали (13 тыс. об./мин, 10 мин) и отбирали 450 мкл супернатанта. Полученные пробы переносили в вials для последующего анализа методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором, для хромато-масс-спектрометрического анализа пробу дополнительно разбавляли в 20 раз.

Органические кислоты. Карбоновые кислоты определяли в образцах сыворотки крови методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) на полярной капиллярной колонке Zebtron ZB FFAP без предварительной дериватизации. Пробу готовили к анализу следующим образом: к 100 мкл сыворотки крови добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта – пивалево́й кислоты (данная кислота отсутствует в сыворотке крови человека), затем добавляли 300 мкл метанола (охл.) и помещали пробу в морозильную камеру на 1 ч. Затем добавляли 800 мкл гексана для очистки от липидов и перемешивали смесь на вортексе в течение 3 мин. Полученную смесь центрифугировали (5 мин, 13 тыс. об./мин) и отбирали 200 мкл водно-метанольного слоя в вial для последующего ГХ-МС-анализа.

Дериватизация органических кислот. Для разделения карбоновых кислот в образцах сыворотки крови методом ГЖХ-МС на неполярной капиллярной колонке HP-5 требовалось проведение дериватизации – получение силильных эфиров карбоновых кислот. Пробоподготовку проводили следующим образом: к 100 мкл сыворотки добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта (пивалево́й кислоты). Далее к образцу добавляли 300 мкл метанола (охл.) для осаждения белков или 100 мкл органического растворителя (диэтиловый эфир, метил-*трет*-бутиловый эфир, хлороформ). Пробу перемешивали на вортексе в течение 2 мин и центрифугировали (10 мин, 12 тыс. об./мин). Затем отделяли супернатант или верхний слой органического растворителя и переносили в другую вial. Пробу выпаривали в термостате досуха при 35–80°C. К сухому остатку добавляли 50 мкл О-метоксиамина гидрохлорида (раствор с концентрацией 20 мг/мл в пиридине) и нагревали в течение 15 мин при 80°C, после чего к раствору пробы добавляли 50 мкл раствора N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамида (МСТФА) и нагревали в течение 15 мин при 80°C. После этого раствор центрифугировали и переносили в вial для последующего ГХ-МС-анализа.

Условия хроматографического определения дансильных производных аминокислот. Хроматогра-

фическое разделение производных аминокислот проводили методом ОФ ВЭЖХ в следующих условиях: подвижная фаза А – 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, подвижная фаза В – ацетонитрил, содержащий 0.1% (по объему) муравьиной кислоты. Скорость потока подвижной фазы 0.3 мл/мин; температура термостата колонки 30°C; объем пробы 10 мкл. Программа градиентного режима элюирования представлена ниже. Дансильные производные определяли при длине волны 280 нм.

Время, мин	0	1	12	13	36	36.5	39
Фаза Б, %	7	7	21	21	54	70	70

Условия хромато-масс-спектрометрического определения органических кислот. Силильные производные органических кислот разделяли методом ГЖХ-МС на капиллярной колонке HP-5 30 м × 0.320 мм × 0.25 мкм (Agilent Technologies, США). Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме сканирования масс в диапазоне m/z 50–450 Да; энергия ионизирующих электронов 70 эВ; режим программирования температуры: 40°C 4 мин; затем увеличение до 300°C со скоростью 10°C/мин; 300°C 5 мин. Общее время анализа – 35 мин. Температура испарителя – 250°C, температура ионного источника – 250°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1.2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1.0 мкл, деление потока 1 : 10.

Недериватизированные органические кислоты разделяли методом ГЖХ-МС на капиллярной колонке Zebtron ZB FFAP 50 м × 0.32 мм × 0.5 мкм (Phenomenex). Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме сканирования масс в диапазоне m/z 50–300 Да; энергия ионизирующих электронов 70 эВ; режим программирования температуры: 70°C 0 мин; затем увеличение до 200°C со скоростью 10°C/мин; до 230°C со скоростью 20°C/мин; 230°C 20 мин. Общее время анализа – 35 мин. Температура испарителя – 250°C, температура ионного источника – 250°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1.2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1.0 мкл, деление потока 1 : 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено выше, актуальной задачей клинической медицины является разработка неинвазивных методов ранней диагностики эндометриоза. Для поиска потенциальных биомаркеров активно применяется метод метаболического профилирования в биологических жидкостях. Характерные для эндометриоза метаболиты относятся в основном к классам аминокислот и низко- и высокомолекулярных карбоновых кислот. В данной работе в качестве анализируемых объектов использовали образцы сыворотки крови больных с диагнозом

эндометриоз ($n = 30$) и миома матки ($n = 30$), предоставленные НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Получение характеристических профилей аминокислот в сыворотке крови больных с эндометриозом. Для определения содержания аминокислот в образцах сыворотки крови требуется проведение

дополнительной стадии получения производных. В данной работе получали N-дансилпроизводные аминокислот (схема 1) по отработанной нами ранее схеме, конверсия близка к количественной. Условия дериватизации оптимизировали методом дизайна эксперимента.

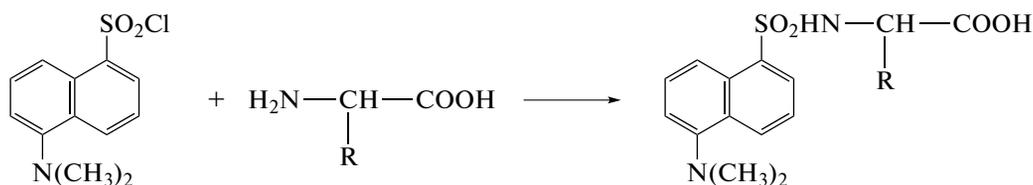


Схема 1. Схема дериватизации аминокислот N-дансилхлоридом.

Перед дериватизацией аминокислот осаждали белки хлорной кислотой, далее в супернатант вводили норлейцин в качестве внутреннего стандарта и проводили дериватизацию раствором дансилхлорида. Получающиеся производные стабильны и их можно детектировать с высокой чувствительностью спектрофотометрическим, флуориметрическим и масс-спектрометрическим методами. В данном исследовании дансильные производные аминокислот определяли спектрофотометрически, что определялось доступностью и стоимостью соответствующего оборудования для большинства лабораторий по сравнению с масс-спектрометрическим детектированием.

Условия селективного разделения дансильных производных аминокислот методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием выбирали, варьируя рН подвижной фазы (1.3, 2.7, 4.0, 7.5), природу органического растворителя (ацетонитрил и метанол) и условия градиентного режима элюирования. Отмечено, что с увеличением рН подвижной фазы (в ацетатном и фосфатном буферных растворах) параметры удерживания дансилсульфоновой кислоты заметно возрастают, в конечном итоге широкий пик от избытка реагента мешает определению некоторых производных аминокислот (рис. 1). Выбрали следующие условия хроматографического определения аминокислот: подвижная фаза ацетонитрил–вода с рН 2.7, содержащая 0.1% муравьиной кислоты, для которой оптимизирован режим градиентного элюирования (см. выше). Хроматограмма смеси стандартов 21 аминокислоты в форме дансильных производных в выбранных условиях представлены на рис. 2.

Оценили основные параметры биоаналитической методики, подтверждающие эффективность и надежность результатов (табл. 1). Для учета влияния матрицы пробы для растворов стандартов построили градуировочные зависимости путем разведения испытуемого образца смеси стандартов с высокой концентрацией в холостой матрице

пробы (усредненная сыворотка крови). Линейность для всех аминокислот соблюдалась во всем диапазоне исследуемых концентраций (0.5–100 мкг/мл, R^2 в диапазоне 0.9979–0.9988). Относительная погрешность определения для большинства аминокислот не превышала 5%. Пределы определения составили 0.5–10 мкг/мл.

В выбранных условиях провели *целевое* метаболическое профилирование: получили хроматографические профили аминокислот в образцах сыворотки крови пациенток с миомой матки ($n = 30$) и эндометриозом ($n = 30$). Примеры хроматограмм для обоих гинекологических заболеваний приведены на рис. 3.

Для выявления потенциальных маркеров эндометриоза провели хемометрическую обработку полученных данных. Для построения модели использовали площади пиков аминокислот, нормированные на площадь норлейцина. Для увеличения точности классификации применили нелинейный метод – *дерево решений*. Точность классификации составила 85%, что является приемлемым. Применение U-критерия Манна–Уитни позволило выявить значимые различия в уровнях содержания аргинина и соотношении аспарагин–глутамин.

Получение характеристических профилей карбоновых кислот в сыворотке крови больных с диагнозом эндометриоз. Прямой анализ смесей карбоновых кислот методом ГХ-МС затруднен. Для их определения в образцах сыворотки крови методом ГХ-МС требуется получение производных – метиловых эфиров карбоновых кислот при определении высокомолекулярных жирных кислот (ВМЖК) и силильных эфиров карбоновых кислот в случае НМЖК. В качестве внутреннего стандарта при определении ВМЖК выбрали трикозановую кислоту, для НМЖК – пивалевую кислоту. Пример характеристического профиля жирных кислот образца сыворотки крови больной с миомой матки приведен на рис. 4. Благодаря наличию в масс-спектрах всех производных ВМЖК характеристического интенсивного осколочного иона с $m/z =$

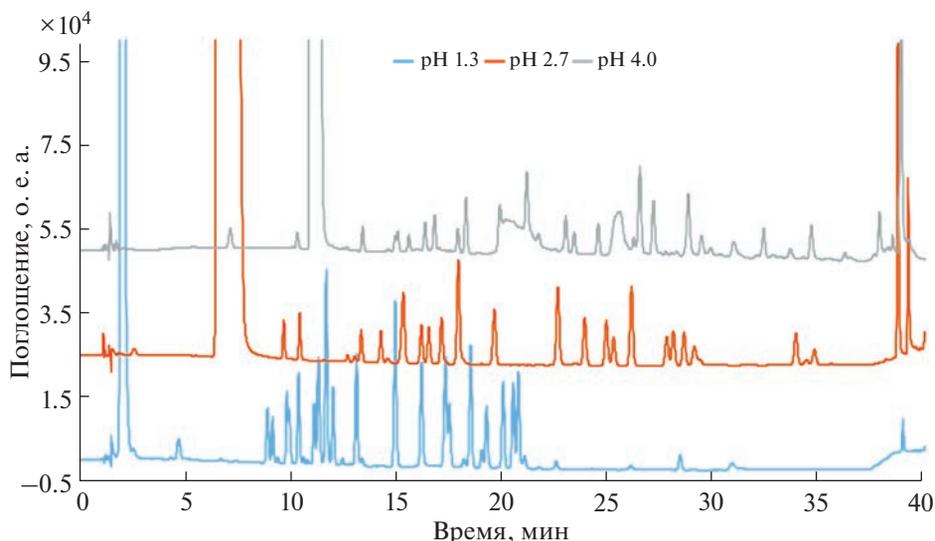


Рис. 1. Хроматограммы смесей стандартов аминокислот в виде производных с дансилхлоридом, полученные методом ОФ ВЭЖХ при различных значениях pH подвижной фазы. Условия ОФ ВЭЖХ-анализа: колонка Luna C18(2) 150 мм × 2.1 мм × 5 мкм; температура колонки +30°C, скорость потока подвижной фазы 0.3 мл/мин; 280 нм. Градиентный режим элюирования (см. табл. 1); подвижная фаза: *хроматограмма серого цвета*: фаза А – 50 мМ ацетатный буферный раствор с pH 4.0, фаза Б – ацетонитрил; *хроматограмма оранжевого цвета*: фаза А – 0.1%-ный водный раствор HCOOH (pH 2.7), фаза Б – 0.1%-ный раствор HCOOH в ацетонитриле; *хроматограмма синего цвета*: фаза А – 0.05%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты (pH 1.3), фаза Б – ацетонитрил.

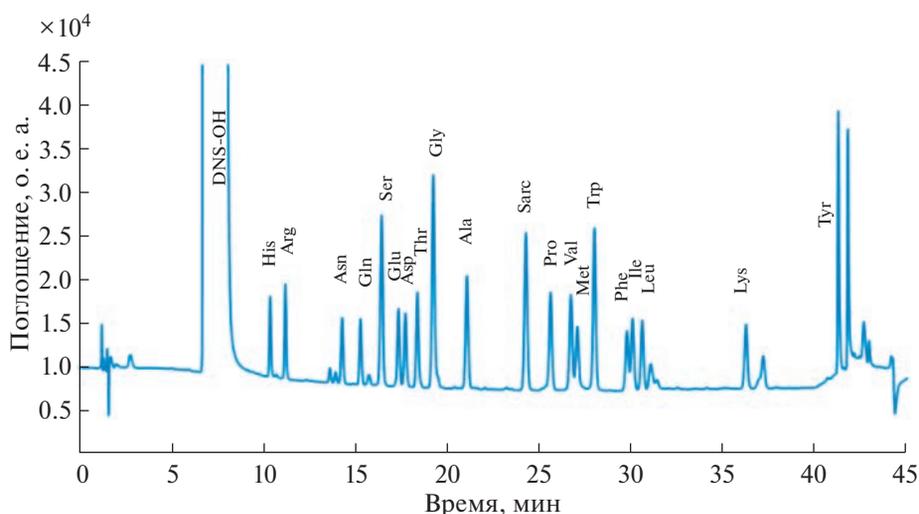


Рис. 2. Хроматограмма смеси стандартов аминокислот в форме дансильных производных. Условия: колонка Luna C18(2) 150 мм × 2.1 мм × 5 мкм; температура колонки: +30°C; 280 нм; скорость потока подвижной фазы 0.3 мл/мин; градиентный режим: фаза А – H₂O, 0.1% HCOOH (pH 2.7), фаза Б – ацетонитрил, 0.1% HCOOH.

= 55, определение аналитов проводили в режиме SIM по данному иону.

В выбранных условиях проанализировали 14 образцов сыворотки крови (7 – эндометриоз, 7 – миома матки). Для выявления потенциальных биомаркеров эндометриоза выполнили хемометрическую обработку полученных данных. Использование методов главных компонент, к бли-

жайших соседей, проекции на латентные структуры обеспечило разделение анализируемых образцов на два кластера согласно их принадлежности. Многократное разбиение массива данных на градуировочный и тестовый наборы позволило определить прогностические способности модели. Значения точности определения образцов составили 80%. Установлено, что содержание пальмитино-

Таблица 1. Аналитические характеристики определения аминокислот методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием

Характеристика	Arg	Asn	Gln	Ser	Glu	Gly	Ala	Pro	Val	Lys	Asp	Sarc	Met	Phe	Ile	Leu	GABA	Thr	Trp
ОСКО в условиях повторяемости, %	8.3	8.3	13.9	8.8	10.7	8.2	11.1	8.3	8.3	8.9	6.1	4.8	5.9	7.0	5.7	6.2	4.0	6.1	6.6
Мера правильности, %	5.5	0.36	5.3	4.3	3.2	0.8	1.7	1.6	5.9	3.1	0.8	5.3	4.5	3.4	2.8	5.2	3.9	5.0	2.4
ПО, мкг/мл	0.013	0.03	0.03	0.0023	0.013	0.0024	0.03	0.03	0.03	0.012	0.007	0.003	0.012	0.021	0.011	0.012	0.14	0.006	0.013
Линейный диапазон	10–100 мкг/мл										0.5–50 мкг/мл								

вой и линолевой кислот статистически значимо отличается при эндометриозе.

Таким образом, ВМЖК могут выступить в качестве потенциальных маркеров отличия миомы матки и эндометриоза, что может быть весьма полезно в клинической практике. Этот вывод требует подтверждения, необходимы дополнительные исследования на больших выборках для определения степени близости профиля жирных кислот при данных патологиях.

Методом ГХ–МС выявили аналитические возможности одновременного определения НМЖК и среднемолекулярных жирных кислот (СМЖК)

(С2–С8). Основные трудности их определения связаны с высокой летучестью и гидрофильностью НМЖК. На первом этапе изучали возможности традиционного подхода в метаболомных исследованиях методом ГХ – определения метаболитов в виде силильных производных. В качестве дериватирующего агента выбрали N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид, поскольку получаемые производные термически более стабильны и при этом менее полярны по сравнению с другими производными. Перед силилированием необходимо осуществить превращение кетогрупп в метоксимные (двойная дериватизация) (схема 2).

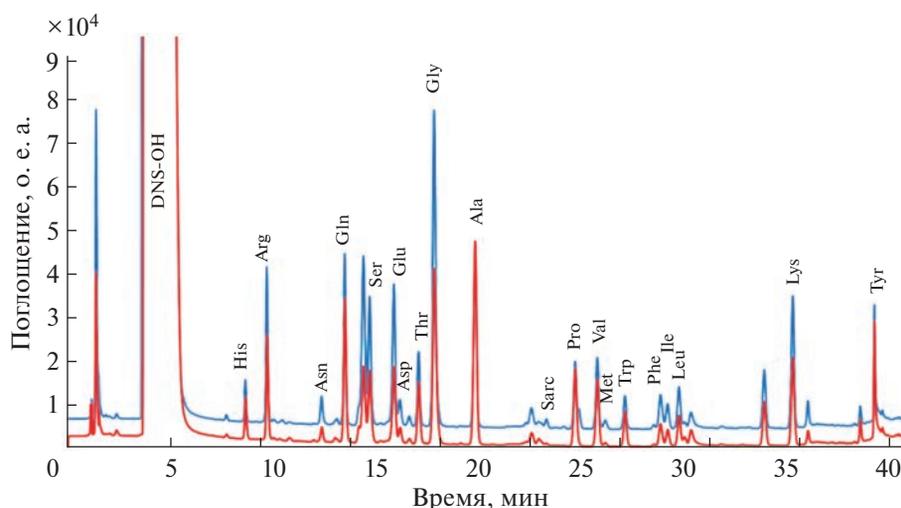


Рис. 3. Хроматограммы дансильных производных аминокислот в сыворотке крови больных с диагнозами эндометриоз (красный цвет) и миома матки (синий цвет) (ОФ ВЭЖХ). Условия: колонка Luna C18(2) 150 мм × 2.1 мм × 5 мкм; температура колонки +30°C; 280 нм; скорость потока подвижной фазы 0.3 мл/мин; градиентный режим элюирования: фаза А – 0.1%-ный водный раствор HCOOH (pH 2.7), фаза Б – 0.1%-ный раствор HCOOH в ацетонитриле.

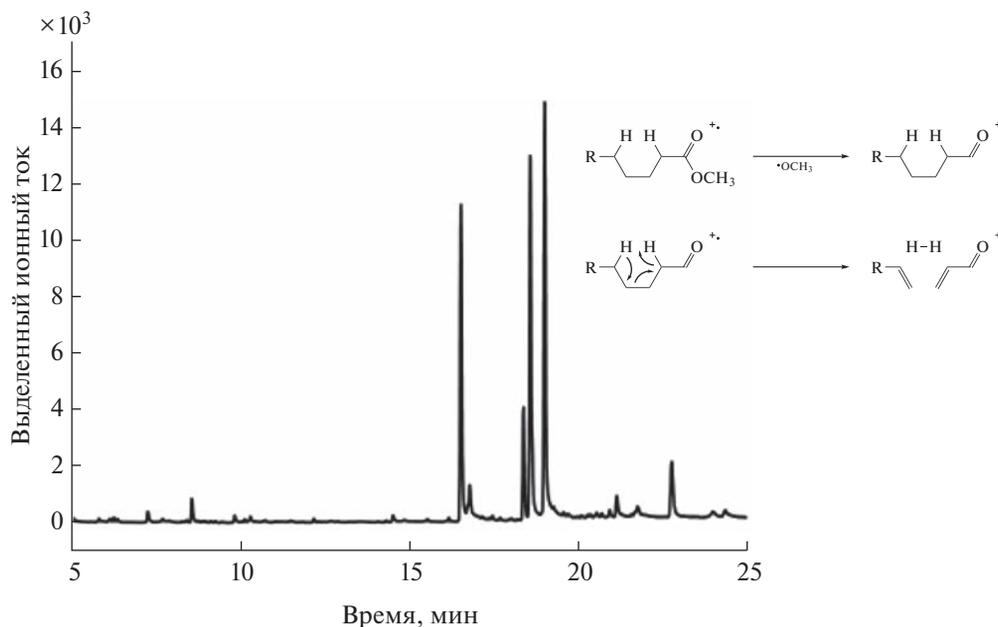
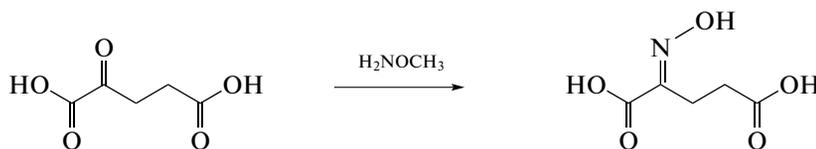


Рис. 4. Характеристический профиль жирных кислот в образце сыворотки крови с миомой матки. GCMS-QP2010 SE с квадрупольным масс-селективным детектором с электронной ионизацией пробы. Хроматографическая колонка WAXplus (OPTIMA 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Режим SIM: m/z 55. Режим программирования температуры.

I: Реакция с O-метоксиамином



II: Реакция с МСТФА

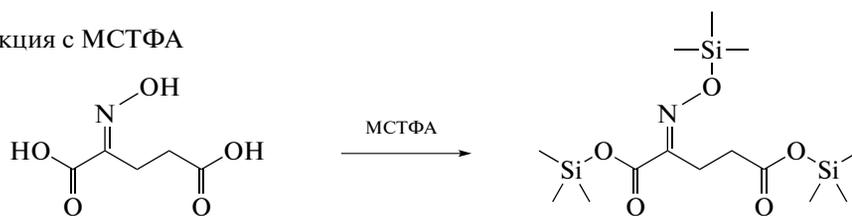


Схема 2. Схема двойной дериватизации органических кислот с O-метоксиамином и N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамидом (МСТФА).

Для определения органических кислот в водных растворах на первом этапе необходима экстракция аналитов в органический растворитель и удаление остатков воды, поскольку получаемые производные легко гидролизуются. Оценили аналитические возможности следующих экстрагентов: диэтилового эфира, этилацетата, дихлорметана, МТБЭ. При использовании дихлорметана происходит постепенное ухудшение и искажение формы хроматографических пиков органических

кислот, а также потеря чувствительности. Диэтиловый эфир из-за чрезвычайно высокой летучести создает проблемы при отборе экстракта (образование пузырей в носике дозатора) и, соответственно, приводит к низкой воспроизводимости результатов. С этилацетатом в качестве экстрагента в кислой среде (pH 2) получены высокие степени извлечения (80–95%), однако в этих условиях возможно получение завышенных результатов опре-

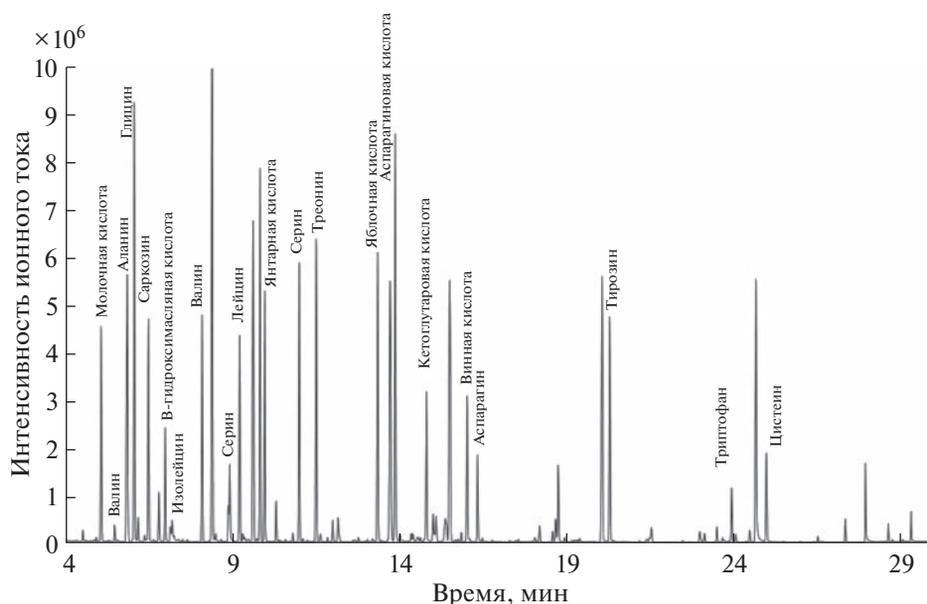


Рис. 5. Хроматограмма раствора стандартов аминокислот и низкомолекулярных органических кислот в форме силильных производных, полученная методом ГХ-МС. Условия ГХ-МС: газовый хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, хроматографическая колонка HP-5 (30 м × 0.320 мм × 0.25 мкм, Agilent); газ-носитель — гелий, скорость потока — 1.2 мл/мин; температурный градиент: 50–300°C со скоростью 10°C/мин; температура испарителя — 250°C; объем пробы — 1 мкл; масс-спектрометр в режиме сканирования ионов (EI 70 эВ, температура ионного источника 250°C, диапазон масс m/z 50–450 Да).

деления уксусной кислоты из-за частичного гидролиза этилацетата в кислой среде.

Таким образом, выбрали следующие условия дериватизации: в качестве экстрагента органических кислот — МТБЭ, реакция с О-метоксиамином — 25 мин при 80°C; реакция с МСТФА — 35 мин при 80°C. Воспроизводимость, оцененная в трех повторях по площадям пиков, составила 3.6–8.1%. Однако данный подход позволяет с высокой селективностью и чувствительностью определять в биологических объектах жирные карбоновые кислоты с числом атомов углерода больше четырех, гидроксикарбоновые и дикарбоновые кислоты, аминокислоты, а также углеводы, но не подходит для определения НМЖК (C1–C4) (рис. 5). Высокая летучесть производных НМЖК уже на стадии пробоподготовки приводит к значительным потерям и невоспроизводимости результатов анализа. Дополнительные эксперименты по выявлению влияния более низких температур на стадии выпаривания пробы и дериватизации не привели к положительным результатам.

Проблему одновременного определения НМЖК и СМЖК решили методом ГХ-МС с полярной стационарной фазой FFAP. В этих условиях выбрали режим температурного градиента для селективного разделения НМЖК, содержащих 2–9 атомов углерода (рис. 6, табл. 2). Преимуществом данного подхода является отсутствие стадии дериватиза-

ции, возможность анализа водных и водно-органических растворов, что особенно важно при анализе биологических жидкостей. Для дальнейшего определения НМЖК в сыворотке крови требуется предварительное осаждение белков. Наиболее часто используемые растворители на этом этапе — метанол, этанол и ацетонитрил. Максимальные степени извлечения органических кислот получили для метанола (81–98%). Оценили аналитические параметры данного метода: пределы обнаружения органических кислот составили ~0.01–0.10 мкг/мл, линейность для всех НМЖК во всем диапазоне исследуемых концентраций (0.5–30 мкг/мл, R^2 в диапазоне 0.9975–0.9989), воспроизводимость 4.0–12%.

В выбранных условиях получили хроматографические профили органических кислот в образцах сывороток крови больных эндометриозом и с миомой матки (рис. 7) и показали возможность проведения метаболомных исследований НМЖК в сыворотке крови. В дальнейших исследованиях акцент будет сделан на хемометрическую обработку полученных данных для выявления потенциальных биохимических маркеров.

Таким образом, проведено целевое профилирование аминокислот в виде дансильных производных методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным

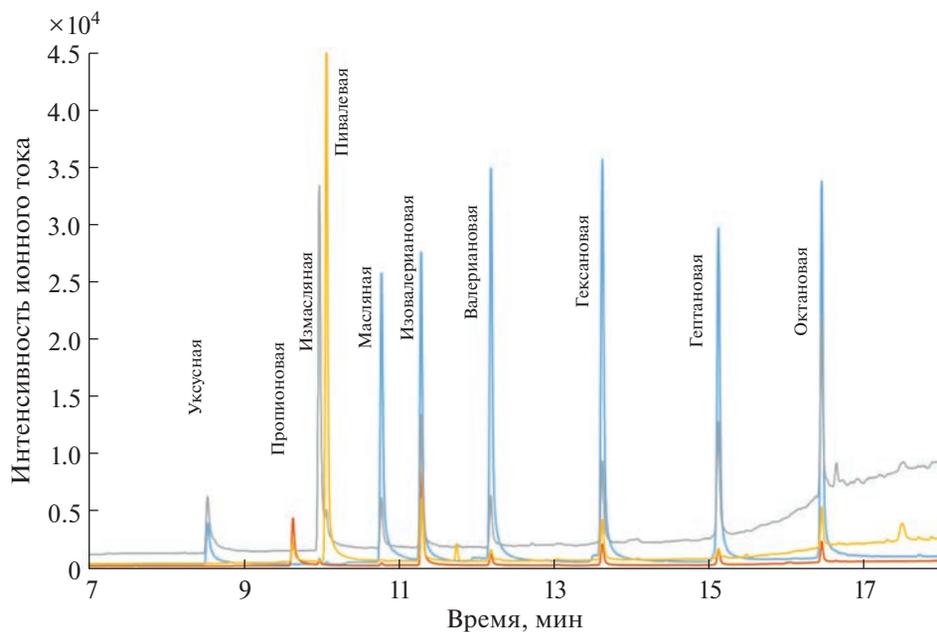


Рис. 6. Хроматограмма по ионному току выделенных масс стандартов низкомолекулярных жирных органических кислот C2–C8 (5 мкг/мл), полученная методом ГХ-МС на капиллярной колонке ZB FFAP (Phenomenex). Условия: газовый хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, хроматографическая колонка Zebtron ZB FFAP 50 м × 0.32 мм × 0.50 мкм (Phenomenex); газ-носитель – гелий, скорость потока – 1.5 мл/мин; температурный градиент: 70–200°C со скоростью 10°C/мин; температура испарителя – 200°C; объем пробы – 1 мкл; масс-спектрометр в режиме сканирования ионов (EI 70 эВ, температура ионного источника 250°C, диапазон масс m/z 50–450 Да).

детектированием в образцах сывороток крови больных с эндометриозом и с миомой матки. Выявлены ограничения классического подхода к определению органических кислот методом ГХ-МС в

виде силильных производных при определении НМЖК. Оптимизированы условия определения НМЖК в сыворотке крови методом ГХ-МС на полярной стационарной фазе без предваритель-

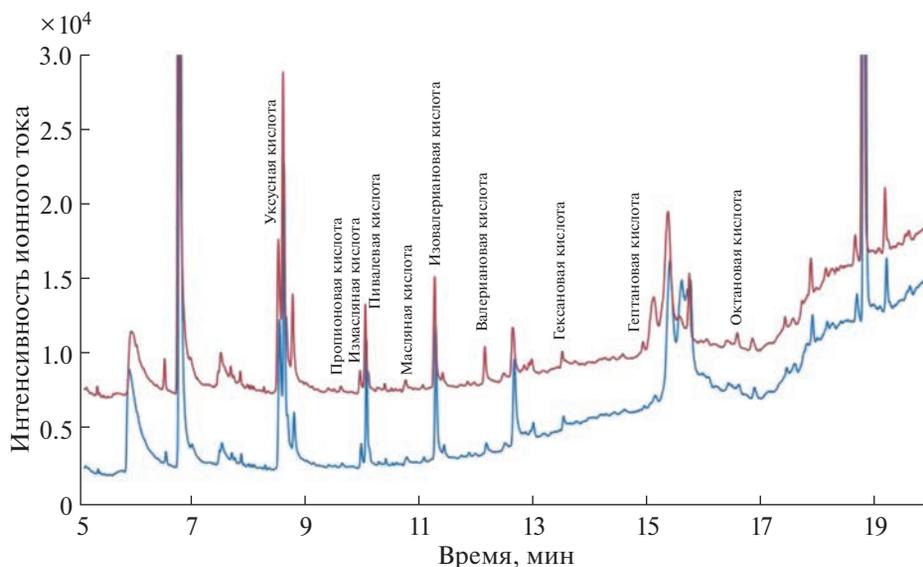


Рис. 7. Сравнение хроматографических профилей по выделенному ионному току органических кислот в сыворотке крови пациенток с диагнозами миома матки (синий цвет) и эндометриоз (красный цвет), полученных методом ГХ-МС без дериватизации.

Таблица 2. Молекулярные массы определяемых органических кислот и массы ионов их основных фрагментов

Кислота	$T_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$	Масса молекулы, m/z	Масса основного фрагмента, m/z
Уксусная	118.1	60.02	43
Пропионовая	141.2	74.04	74
Масляная	163.5	88.05	60
Изомасляная	152–155	88.05	60
Валериановая	185.4	102.06	60
Изовалериановая	176.5	102.06	60
Капроновая	202–203	116.08	60
Гептановая (энантовая) кислота	223	130.18	60
Октановая (каприловая) кислота	237	144.21	60
Пивалевая кислота (2,2-диметилпропионовая кислота)	164	102.13	57

ной дериватизации. Пределы обнаружения составили для аминокислот 0.0024–0.12 мкг/мл, для органических кислот – 0.05–0.10 мкг/мл.

Выражаем благодарность Ресурсному центру СПбГУ “Методы анализа состава вещества” за предоставленное оборудование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер гранта 19-13-00370).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giudice L.C. Clinical practice. Endometriosis // N. Engl. J. Med. 2010. V. 362. P. 2389. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1000274>
2. Govorov I., Sitkin S., Pervunina T., Moskvina A., Baranenko D., Komlichenko E. Metabolomic biomarkers in gynecology: A treasure path or a false path? // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. № 22. P. 3611. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190104124245>
3. Kartsova L.A., Bessonova E.A., Deev V.A., Kolobova E.A. Current role of modern chromatography with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy in the investigation of biomarkers of endometriosis // Crit. Rev. Anal. Chem. 2023. P. 1. (Epub ahead of print). <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2156770>
4. Dutta M., Singh B., Joshi M. Metabolomics reveals perturbations in endometrium and serum of minimal and mild endometriosis // Sci. Rep. 2018. № 8. P. 6466. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23954-7>
5. Dutta M., Josh M., Srivastava S., Lodh I., Chakravarty B., Chaudhury K. A metabolomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis // Mol. Biosyst. 2012. V. 8. P. 3281. <https://doi.org/10.1039/c2mb25353d>
6. Jana S.K., Dutta M., Joshi M., Srivastava S., Chakravarty B., Chaudhury K. ^1H NMR based targeted metabolite profiling for understanding the complex relationship connecting oxidative stress with endometriosis // BioMed Res. Int. 2013. Article 329058. <https://doi.org/10.1155/2013/329058>
7. Vicente-Muñoz S., Morcillo I., Puchades-Carrasco L., Payá V., Pellicer A., Pineda-Lucena A. Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a non-invasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis // Fertil. Steril. 2015. V. 104. № 5. P. 1202. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1149>
8. Vicente-Muñoz S., Morcillo I., Puchades-Carrasco L., Payá V., Pellicer A., Pineda-Lucena A. Pathophysiological processes have an impact on the plasma metabolomic signature of endometriosis patients // Fertil. Steril. 2016. V. 106. № 5. P. 1733. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.014>
9. Li J., Guan L., Zhang H., Gao Y., Sun J., Gong X., Li D., Chen P., Liang X., Huang M. Endometrium metabolomic profiling reveals potential biomarkers for diagnosis of endometriosis at minimal-mild stages // Reprod. Biol. Endocrinol. 2018. V. 16. № 1. P. 42. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0360-z>
10. Wang L.-L., Guo H.-H., Huang S., Feng C.-L., Han Y.-X., Jiang J.-D. Comprehensive evaluation of SCFA production in the intestinal bacteria regulated by berberine using gas-chromatography combined with polymerase chain reaction // J. Chromatogr. B. 2017. V. 1057. P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.004>
11. Chadchan S.B., Popli P., Ambati C.R., Tycksen E., Han S.J., Bulun S.E., Putluri N., Biest S.W., Kommagani R. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids protect against the progression of endometriosis // Life Science Alliance. 2021. V. 4. № 12. Article e202101224. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101224>
12. Zeng M., Cao H. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1083. P. 137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.040>
13. Mulat D.G., Feilberg A. GC/MS method for determining carbon isotope enrichment and concentration of underivatized short-chain fatty acids by direct aqueous solution injection of biogas digester samples // Talanta. 2015. V. 143. P. 56. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.065>

14. Amer B., Nebel C., Bertram H.C., Mortensen G., Dalsgaard T.K. Direct derivatization vs. aqueous extraction methods of fecal free fatty acids for GC–MS analysis // *Lipids*. 2015. V. 50. P. 681. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4029-5>
15. Zhang H., Wang Z., Liu O. Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids // *J. Pharm. Anal.* 2015. V. 5. № 4. P. 223. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005>
16. Douny C., Dufourny S., Brose F., Verachtert P., Rondia P., Lebrun S., Scippo M.-L. Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME–GC–MS in samples coming from an in vitro gastrointestinal model // *J. Chromatogr. B*. 2019. V. 1124. P. 188. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.01>
17. Gao H., Yu X., Sun R., Yang N., He J., Tao M., Wang G. Quantitative GC–MS assay of citric acid from humans and db/db mice blood serum to assist the diagnosis of diabetic nephropathy // *J. Chromatogr. B*. 2018. V. 1077–1078. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.021>
18. Lu X., Fang M., Dai Y., Yang Y., Fan A., Xu J., Li N. Quantification of triacontanol and its PEGylated prodrug in rat plasma by GC–MS/MS: Application to a pre-clinical pharmacokinetic study // *J. Chromatogr. B*. 2018. V. 1089. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.037>
19. Rios-Covian D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilan C.G., Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>