

УДК 543.51, 615.074, 543.544.5.068.7

© И. А. Краснов, Д. Е. Бобков, М. Зайцева, С. С. Присяч, Н. В. Краснов

## РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МС-МЕТОДА ДЛЯ АНАЛИЗА УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В РЕЖИМЕ РЕГИСТРАЦИИ ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ИОНОВ

Настоящая работа посвящена разработке ВЭЖХ-МС-метода анализа желчных кислот на примере урсодезоксихоловой кислоты. Показана возможность применения масс-спектрометрического оборудования с режимами получения положительно заряженных ионов для анализа желчных кислот. Получены данные об изменении концентрации урсодезоксихоловой кислоты в сыворотке крови крыс в зависимости от времени после внутривенного введения урсодезоксихоловой кислоты.

*Кл. сл.:* масс-спектрометр MX-5310, желчные кислоты, ВЭЖХ-МС в режиме регистрации положительных ионов

### ВВЕДЕНИЕ

К желчным кислотам (ЖК) относят гетерогенную группу соединений, структурной основой которых является холестерол. Желчные кислоты (ЖК) играют ведущую роль в метаболизме холестерина и липидов [1]. Кроме того, ЖК обладают эндокринными функциями, выступая в качестве сигнальных молекул-лигандов или модуляторов рецепторов гормонов. Воздействуя на широкий спектр сигнальных путей, ЖК регулируют липидный обмен и энергетический баланс организма [2, 3]. Это делает их перспективными фармакологическими агентами для лечения заболеваний метаболического и сосудистого происхождения, таких как ожирение, диабет второго типа и атеросклероз [4, 5]. Также концентрация ЖК в крови является важным диагностическим показателем при оценке состояния желудочно-кишечного тракта. Измерение уровня ЖК может выступать способом ранней диагностики различных патологических состояний [6–9].

На данный момент наиболее используемым вариантом анализа ЖК в биологических матрицах является сочетание методов хроматографии и масс-спектрометрии [10, 11]. Так, для определения ЖК в сыворотке крови и моче широко применялась газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС) [7–11]. К недостаткам метода можно отнести сложную пробоподготовку, включающую гидролиз и дериватизацию. Позже использовалась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектором. Применение ВЭЖХ исключило стадию дериватизации и значительно

упростило пробоподготовку. Основным недостатком метода — низкая чувствительность из-за недостаточной оптической плотности ЖК в УФ-диапазоне, что особенно проявляется при анализе образцов сыворотки крови [8]. Важную роль в эволюции методологии исследования желчных кислот сыграла разработка мягких методов ионизации ЭРИАД (экстракция ионов из раствора при атмосферном давлении) [12, 13] и ESI (электрораспыление) [14], совместимых с жидкостной хроматографией. Сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором позволило проводить быстрый и чувствительный анализ ЖК [15–20].

На сегодняшний день все разработанные методы используют источники ионов с получением отрицательно заряженных молекул (ESI–), разумно обосновывая это низкой эффективностью ионизации большей части ЖК в режиме получения положительно заряженных ионов (ESI+) [1, 20]. Однако наиболее распространенными в протеомных и пептидомных исследованиях являются масс-спектрометры с ESI+ источниками ионов. Таким образом, существует потребность в разработке методов, позволяющих проводить количественный анализ ЖК с помощью масс-спектрометров, оборудованных ESI+ источниками ионов.

Целью данной работы была разработка ВЭЖХ-МС-метода для анализа ЖК в сыворотке крови крыс с использованием ESI+ варианта источника ионов (Милихром A02-MX5310). В качестве объекта исследования нами была использована урсодезоксихоловая кислота (3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -диокси-5 $\beta$ -холановая кислота, UDCA), являющаяся представителем первичных желчных кислот [21, 22].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования выполнены на 55 крысах самцах после внутрижелудочного введения UDCA в дозе 130 мг/кг. Препарат вводился внутрижелудочно из расчета 130 мг/кг с утра натощак. Стандартное питание животные получали через 2 ч после начала эксперимента. На каждую точку брали по 5 животных.

Кровь отбирали после декапитации через определенные интервалы времени: 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ч после введения препарата.

Пробы крови центрифугировали 15 мин при 3 000 об./мин, отбирали по 1,5–2,0 мл плазмы, замораживали и хранили при –20 °С до анализа.

#### Пробоподготовка

Из полученных образцов отбирали по 300 мкл сыворотки. Низкомолекулярную фракцию плазмы крови крыс получали с помощью осаждения белков плазмы добавлением 1 мл ацетонитрила с 2 % уксусной кислоты. Образец выдерживали в течение 30 мин при 4 °С с последующим центрифугированием при 13 000 g в течение 30 мин. Супернатант отбирали и высушивали, затем разводили в 25 мкл ультрачистой воды и наносили 10 мкл полученной смеси (соответствует 92 мкл начального образца сыворотки) на колонку C18 2×75 мм в системе ОФ-ВЭЖХ-МС (Милихром А02 / МХ-5310).

Для подбора условий ВЭЖХ-МС-анализа и построения калибровочной кривой готовили растворы стандарта урсодезоксихолевой кислоты в диапазоне концентраций от 1 до 35 мкг/мл, которые также наносили на колонку. С помощью этих же стандартов определяли время выхода UDCA из колонки в каждом варианте разрабатываемой методики. Концентрацию UDCA в сыворотке крови пересчитывали с учетом концентрирования образца при пробоподготовке.

#### Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для разделения компонент низкомолекулярной фракции сыворотки крови крыс использовали жидкостный хроматограф Милихром А02 ("Эко-

Нова", Новосибирск) с установленной обращенно-фазной колонкой C18 (75 мм — длина, 2 мм — внутренний диаметр), диаметр зерна — 5 мкм, число теоретических тарелок — 6 000. В качестве элюентов использовали ацетонитрил и деионизированную воду с 0,5 % уксусной кислоты. Разделение проводили в градиенте ацетонитрил—вода со скоростью 100 мкл/мин от 5 % ацетонитрила до 80 % за 1 мин; с 1 по 8 мин разделение проводили в изократическом режиме при 80 % ацетонитрила. После проведения анализа колонку промывали 95 % ацетонитрилом в течение 5 мин со скоростью потока 300 мкл/мин, затем проводили регенерацию колонки 5 % ацетонитрилом (2 мин, 300 мкл/мин). Общее время, затрачиваемое на один анализ, составляло 15 мин. В течение всего хроматографического анализа проводили масс-спектрометрический анализ выходящего из колонки элюата.

#### Масс-спектрометрический анализ

Для проведения масс-спектрометрического анализа использовали времяпролетный масс-спектрометр МХ-5310 с электрораспылительным источником ионов ESI+ (ИАП РАН). Анализ проводили в режиме прямого ввода образца и в режиме электрораспыления потока элюата, подаваемого хроматографом.

В режиме прямого ввода образца масс-спектрометра МХ-5310 проба из стеклянного шприца поступает в пластмассовый капилляр со скоростью 4 мкл/мин при помощи насоса Harvard 55-1199. Диаметр пластмассового капилляра составляет 0,1 мм, на его конце располагается металлический капилляр внутренним диаметром 0,1 мм, к которому приложено напряжение 3–4 кВ. Аксиально с этим капилляром расположен металлический капилляр большего диаметра, по которому подается углекислый газ [23].

В режиме ВЭЖХ-МС распыления потока элюата применяли следующие условия ионизации: температура спутного газа (CO<sub>2</sub>) — 200 °С, давление газа распыляющего потока — 50 Па. Скорость регистрации единичных масс-спектров — 100 спектров в секунду. Обработку хромато-масс-спектрограмм проводили следующим образом:

Список масс, принадлежащих UDCA и обнаруженных в масс-спектре

Форма UDCA	Масса расчетная	Обнаружено в спектре (МН <sup>+</sup> )
UDCA	392.29	393.3
UDCA – H <sub>2</sub> O	374.28	375.29
UDCA – 2H <sub>2</sub> O	356.27	357.28
UDCA + Na	415.28	415.28

1) для получения суммированного масс-спектра UDCA на хроматограмме общего ионного тока выделяли временной промежуток 360–400 с;

2) по моноизотопному сигналу с соотношением  $m/z$ , соответствующим урсодезоксихолевой кислоте и ее дегидратированным продуктам (таблица), строили кривые ионного тока отдельных сигналов;

3) в зависимости от времени выхода искомого соединения получали суммированный масс-спектр хроматографического сигнала;

4) определяли площади пиков суммированных масс-спектрометрических сигналов, соответствующих исследуемым соединениям;

5) обрабатывали полученные данные в программном пакете Origin (OriginLab Corporation).

Во всех режимах работы масс-спектрометра использовали следующие параметры: массовый диапазон — от 50 до 3000 Да, распылительное напряжение — 3200 В, напряжение на сопле — 100 В, напряжение на скиммере — 60 В, радиочастотное (RF) напряжение транспортного квадруполя — 700 В.

Для калибровки масс-спектрометра MX-5310

был приготовлен раствор тестового соединения резерпина в концентрации  $10^{-7}$  М ( $6.1 \times 10^{-2}$  мг/л). Калибровку проводили по сигналам, соответствующим протонированным формам резерпина (609.28 Да) и его фрагмента (195.06 Да).

Управление настройками и регистрацию масс-спектров проводили с помощью программы "TOF control". Масс-спектры и хромато-масс-спектрограммы записывали с помощью программы "TOF Acqizor" и обрабатывали при помощи программного обеспечения "TOF explorer v0.2". Точная мономерная масса и форма изотопного распределения вычислялись при помощи программы "MassPro" (масс-спектрометр и программные продукты разработаны в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАП РАН).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые соединения являются кислыми соединениями с рКа, равным ~ 1.5 для таурин-связанной, ~ 4.5 для глицин-связанной и ~ 6 для неконоъюгированной форм. Даже в кислых условиях (рН 3–4) эти соединения находятся в депротонированной

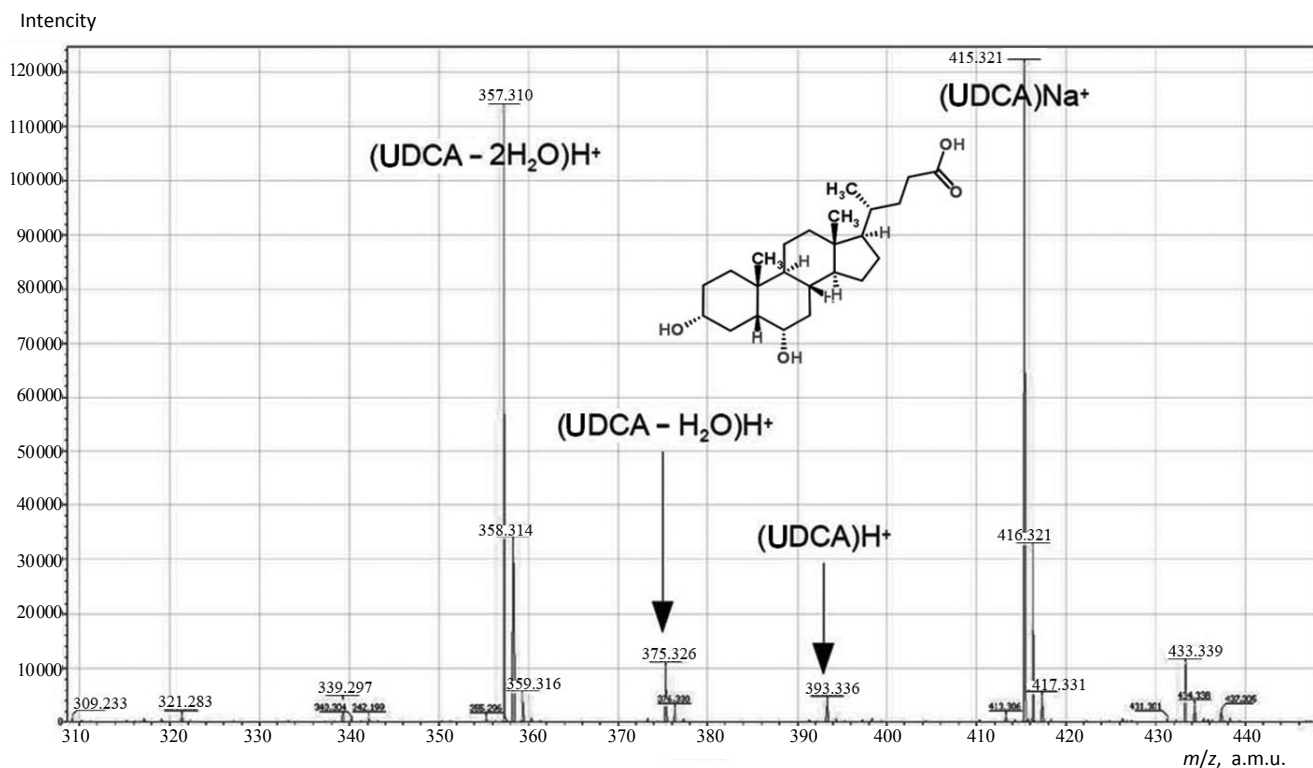


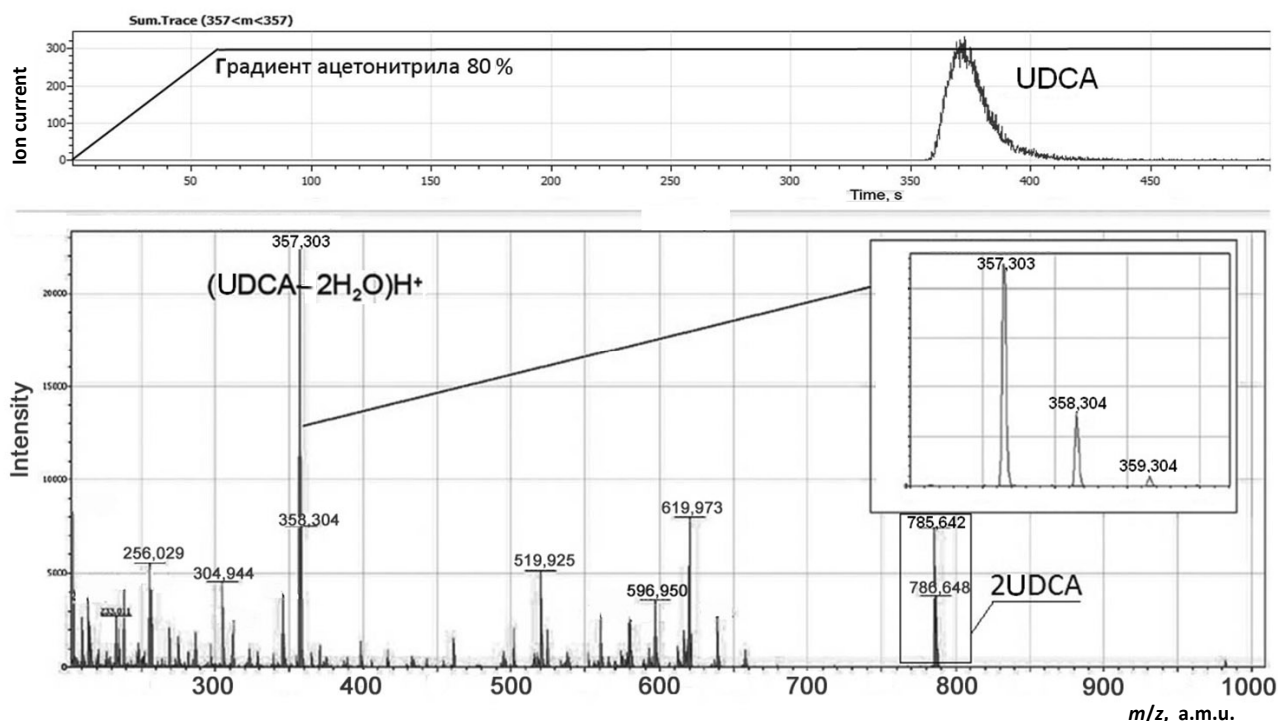
Рис. 1. Масс-спектр препарата UDCA в концентрации 100 мкМ (режим прямого ввода пробы) в растворителе ацетонитрил—вода—уксусная кислота (49.75/49.75/0.5)

и нейтральной формах (таурин-связанные кислоты) или в виде нейтральных молекул (глицин-связанная и неконъюгированная формы), что делает затруднительным масс-спектрометрический анализ в режиме регистрации положительных ионов, как в случае использования масс-спектрометра MX-5310.

Проведенный анализ чистого препарата UDCA в высокой (100 мкМ) концентрации в режиме прямого ввода в масс-спектрометр выявил ряд сигналов, принадлежащих различным формам UDCA. На рис. 1 представлены сигналы с  $MH^+$  (моноизомерная масса протонированного соединения) 357.3, 375.3, 393.3, 415.3 Да, соответствующие дважды дегидратированной ( $-2H_2O$ ), дегидратированной ( $-H_2O$ ), протонированной и натриевой формам UDCA соответственно. Сигнал исходной протонированной формы UDCA ( $MH^+=393.3$  Да) является самым слабым. Основными по интенсивности в спектре являются сигналы Na-связанной и дидегидратированной форм предоставленного соединения. Сильный сигнал формы (UDCA  $-2H_2O$ ) по сравнению с интактной формой может быть связан с увеличением аффинности к протону при дегидратировании. Список масс, принадлежащих

UDCA, представлен в таблице.

Также был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ стандарта UDCA в режиме получения положительно заряженных ионов. При электрораспылении элюата сигналы Na-связанной и протонированной форм UDCA исчезают, в спектре доминирует сигнал (UDCA  $-2H_2O$ ) $H^+$  357.3 Да (рис. 2), что может быть связано с жесткими условиями ионизации (температура распыляющего газа — 200 °С) и кислотными свойствами элюата. Дополнительным подтверждением правильности определения хроматографического пика, относящегося к UDCA, может служить сигнал димера урсодезоксихолевой кислоты ( $MH^+$  758.6 Да), который стабилен в данных условиях. Элюция стандарта из колонки в выбранном режиме анализа происходила на шестой минуте, в дальнейшем это время было использовано в качестве дополнительного подтверждения правильности определения UDCA в многокомпонентных образцах. Таким образом, нами была показана принципиальная возможность проведения ВЭЖХ-МС-анализа UDCA в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

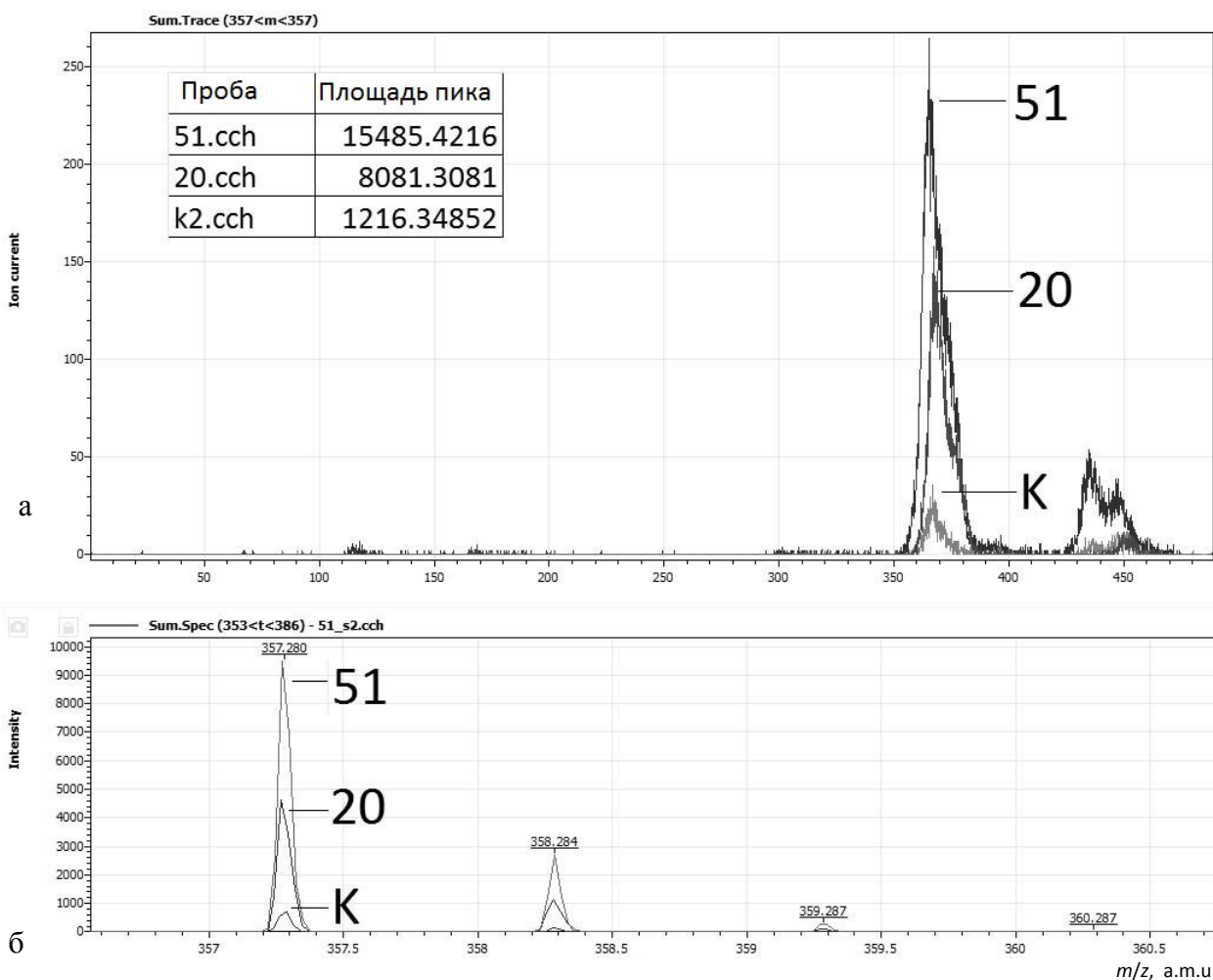


**Рис. 2.** Результат ОФ-ВЭЖХ-МС-анализа препарата UDCA (10 нМ на колонку).

Представлен фрагмент масс-спектра, содержащий дидегидратированную форму UDCA. Отдельно представлен сигнал (UDCA  $-2H_2O$ ) $H^+$  и его изотопное распределение

Далее, для апробации разработанной хромато-масс-спектрометрической методики мы провели анализ образцов сыворотки крови крыс, получавших UDCA внутривенно в дозе 130 мг/кг. Были исследованы 50 образцов, разбитых на 10 групп по 5 в каждой в зависимости от времени забора крови у животных. Каждый образец был обработан по схеме, описанной в разделе "Экспериментальная часть". На рис. 3 приведены фрагменты масс-спектров контрольного образца, образцов 20 и 51. Также приведены хроматограммы по ионному току сигналов UDCA в этих образцах. Представлена таблица значений Peak weight для каждого

масс-спектрометрического пика, соответствующих их площадям. В области хроматограммы 7.5 мин наблюдается увеличение ионного тока сигнала с  $m/z$  357.3 Да, что может быть признаком элюции с колонки какой-либо из желчных кислот, которые также деградируют с потерей молекул  $H_2O$ . Однако анализ стандартного образца UDCA показал, что по времени выхода этих соединений с колонки они не могут быть отнесены к исследуемому соединению. Вместе с тем литературные данные [24–27] указывали на эффективное разделение ЖК с помощью обращеннофазных колонок C18, поэтому такие сигналы нами не обрабатывались.

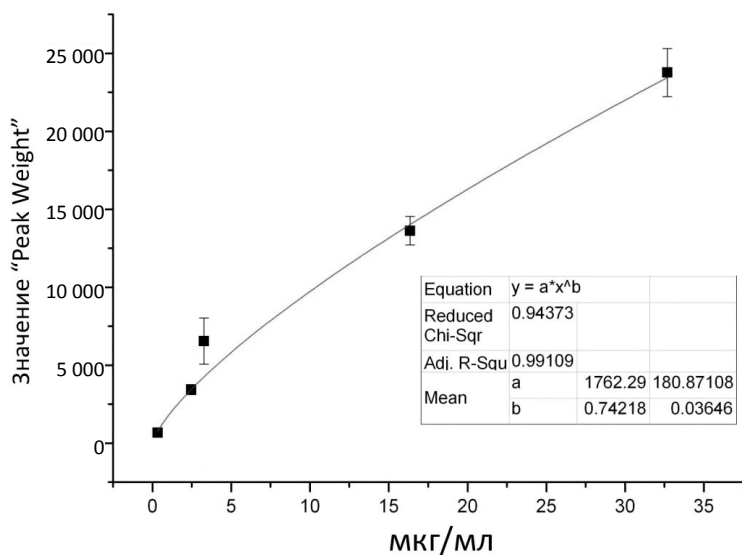


**Рис. 3.** Пример обработки хромато-масс-спектрограмм.

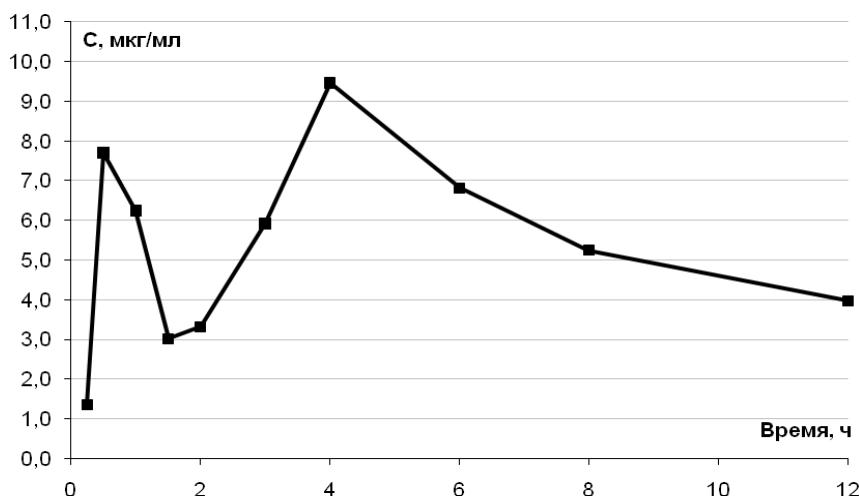
Представлены фрагменты хроматограммы (а) и масс-спектров (б) ионного тока, соответствующие сигналу UDCA –  $H_2O$

Для того чтобы соотнести полученные значения Peak Weight с концентрацией вещества в образцах, были проведены измерения стандартных растворов UDCA и построена калибровочная кривая. Для каждой точки проводилось пять измерений, результат представлен на рис. 4. С использованием данной калибровочной кривой значения Peak Weigh, полученные в результате анализа, были переведены в значения концентрации мкг/мл с

учетом концентрирования образца перед нанесением на колонку (10 мкл образца соответствуют 92 мкл сыворотки). Далее, с использованием программного пакета Origin была построена кривая зависимости концентрации UDCA от времени после воздействия ЖК на животное (рис. 5). Полученные результаты измерения концентрации UDCA в сыворотке крови крыс контрольной группы (0.14 мкг/мл) согласуются с данными [28].



**Рис. 4.** Калибровочная кривая стандарта UDCA. Сопоставлены площадь масс-спектрометрического сигнала и концентрация



**Рис. 5.** Изменение концентрации UDCA в сыворотке крови крыс в зависимости от времени

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате работы была разработана аналитическая ВЭЖХ-МС-методика определения желчной кислоты UDCA в сыворотке крови крыс. Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения низкомолекулярной фракции плазмы крови крыс, в которых сигнал UDCA является единственным мажорным в своей области хромато-масс-спектрограммы. Полное время хроматографического анализа с регенерацией колонки составило 15 мин, что делает разработанный метод применимым для использования в исследованиях с большим количеством образцов, в том числе в фармакокинетических работах. Впервые показана возможность применения масс-спектрометрического оборудования, в частности отечественного масс-спектрометра МХ-5310 (ИАП РАН) с режимами получения положительно заряженных ионов, для анализа желчных кислот.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tagliacozzi D., Mozzi A.F., Casetta B., Bertucci P., Bernardini S., Di Ilio C., Urbani A., Federici G. Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003. V. 41, N 12. P. 1633–1641.
2. Scherer M., Gnewuch C., Schmitz G., Liebisch G. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography—tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877. P. 3920–3925.
3. Houten M., Watanabe M., Auwerx J. Endocrine functions of bile acids // *EMBO J.* 2006. V. 25, N 7. P. 1419–1425.
4. Thomas C., Pellicciari R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008. N 7. P. 678.
5. Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 147.
6. Roda A., Gioacchini A.M., Cerrè C., Baraldini M. High-performance liquid chromatographic—electrospray mass spectrometric analysis of bile acids in biological fluids // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 665. P. 281–294.
7. Roda A., Piazza F., Baraldini M. Separation techniques for bile salts analysis // *J. Chromatogr. B.* 1998. V. 717. P. 263–278.
8. Street J.M., Trafford D.J.H., Makin H.L.J. The quantitative estimation of bile acids and their conjugates in human biological fluids // *J. Lipid. Res.* 1983. N 24. P. 491–511.
9. Setchell K.D., Matsui A. Serum bile acid analysis // *Clin. Chim. Acta.* 1983. V. 127. P. 1–17.
10. Scalia S. Bile acid separation // *J. Chromatogr. B.* 1995. V. 671. P. 299–317.
11. Batta A.K., Salen G. Gas chromatography of bile acids // *J. Chromatogr. B.* 1999. V. 723. P. 1–16.
12. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Павленко В.А., Шкуров В.А. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении — метод масс-спектрометрического анализа биоорганических веществ // *ДАН СССР.* 1984. № 277. С. 379–383.
13. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Шкуров В.А., Николаев В.И. Электродинамический ввод жидких веществ в масс-спектрометр // *ЖТФ.* 1984. № 54. С. 11559–11571.
14. Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray Ion Source. Another variation on the free jet theme // *J. Phys. Chem.* 1984. V. 88, N 20. P. 4451–4459.
15. Mills K.A., Mushtaq I., Johnson A.W., Whitfield P.D., Clayton P.T. A method for the quantitation of conjugated bile acids in dried blood spots using electrospray ionization-mass spectrometry // *Pediatr. Res.* 1998. V. 43. P. 361–368.
16. Mushtaq I., Logan S., Morris M. et al. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disease with tandem mass spectrometry // *Br. Med. J.* 1999. V. 319. P. 471–477.
17. Johnson D.W., ten Brink H.J., Schuit R.C., Jakobs C. Rapid and quantitative analysis of unconjugated C27 bile acids in plasma and blood samples by tandem mass spectrometry // *J. Lipid. Res.* 2001. V. 42. P. 9–16.
18. Bootsma A.H., Overmars H., van Rooij A. et al. Rapid analysis of conjugated bile acids in plasma using electrospray tandem mass spectrometry: application for selective screening of peroxisomal disorders // *J. Inher. Metab. Dis.* 1999. V. 22, N 3. P. 307–310.
19. Perwaiz S., Tuchweber B., Mignault D., Gilat T., Yousef I.M. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry // *J. Lipid. Res.* 2001. V. 42. P. 114–119.
20. Xiang X., Han Y., Neuvonen M. et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of bile acid concentrations in human plasma // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878, N 1. P. 51–60.
21. Eyssen H.J., De Pauw G., Van Eldere J. Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed UDCA-1 isolated from rat intestinal microflora // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65, N 7. P. 3158–3163.
22. Matern H., Lappas N., Matern S. Isolation and characterization of hyodeoxycholic-acid: UDP-glucuronosyltransferase from human liver // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 200, N 2. P. 393–400.
23. Гаврик М.А., Корнев Д.Н., Мурадымов М.З. Исследование характеристик газодинамического интерфейса в составе временипролетного масс-спектрометра МХ 5311 // *Научное приборостроение.* 2010. Т. 20, № 4. С. 114–119.
24. Ando M., Kaneko T., Watanabe R. et al. High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. V. 40, N 5. P. 1179–1186.

25. *Griffiths W.J., Sjövall J.* Bile acids: analysis in biological fluids and tissues // *J. Lipid. Res.* 2010. V. 51, N 1. P. 23–41.
26. *Ikegawa S., Okuyama H., Oohashi J. et al.* Separation and detection of bile acid 24-glucuronides in human urine by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Sci.* 1999. V. 15. P. 625–631.
27. *Alnouti Y., Csanaky I.L., Klaassen C.D.* Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS // *J. Chromatogr. B.* 2008. V. 873. P. 209–217.
28. *García-Cañaveras J.C., Donato M.T., Castell J.V., Lázaro A.* Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method // *J. Lipid. Res.* 2012. V. 53, N 10. P. 2231–2241.

*Институт аналитического приборостроения РАН,  
г. Санкт-Петербург*

Контакты: *Краснов Илья Александрович,  
krasnov.ilya@gmail.com*

Материал поступил в редакцию 18.12.2012

## THE DEVELOPMENT OF HPLC-ESI-MS(+) METHOD FOR URSODEOXYCHOLIC ACID ANALYSIS

**I. A. Krasnov, D. E. Bobkov, M. Zaitseva, S. S. Prisyach, N. V. Krasnov**

*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

An analytical method for ursodeoxycholic acid has been developed based on high performance liquid chromatography separation coupled to an electrospray (+) time-of-flight mass-spectrometer. Data about the change of UDCA concentration after intragastric injection in rat serum depending on time are obtained.

*Keywords:* MX-5310 mass-spectrometer, bile acids, HPLC-MS, positive mode ESI