



УДК 543.544

ВЭЖХ анализ пролина и 4-гидроксипролина в биологических жидкостях. HPLC analysis of proline and 4-hydroxyproline in biological fluids

Дутов А.А., Никитин Д.А., Мищенко М.Н., Семенова А.Н.,
Мартынова А.В., Сверкунова А.В., Федорова Е.Н., Коновалова О.Н.,
Лукьянова Ю.Л., Ермолина А.В., Пинелис И.С.

*ГБОУ ВПО Читинская медицинская академия, Чита
ФГБОУ ВПО Забайкальский государственный университет, Чита*

Поступила в редакцию 3.09.2012 г.

Аннотация

Предложен ВЭЖХ метод определения пролина и 4-гидроксипролина в плазме крови, слюне и слезной жидкости. Биологические образцы депротенизировали ацетонитрилом. Дериватизировали иминокислоты 9-флюоренилметилхлороформатом (Fmoc-Cl) после блокады аминокислот с первичными аминогруппами ортофталевым альдегидом/2-меркаптоэтанолом. Дериваты разделяли с помощью обращено-фазной (C18) ВЭЖХ и флюориметрической детекцией ex260-em330 нм. Использовали колонки Luna C18(2) (75 × 4.6 мм, 3 мкм), Gemini C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм), обе Phenomenex (США), а также высокоскоростные колонки (100 × 4.6 мм) Chromolith Performance RP-18e, Merck (Германия). Для скрининга на гиперпролинемию у новорожденных предложен метод разделения на высокоскоростных колонках с монолитным сорбентом Chromolith Performance RP-18e. Простота, воспроизводимость и высокая чувствительность метода, позволяют его использование в клинической практике для оценки биохимических изменений при глазных и стоматологических заболеваниях, а также для скрининга на врожденную гиперпролинемию у новорожденных.

Ключевые слова: ВЭЖХ, флюориметрическая детекция, пролин, 4-гидроксипролин, плазма, слюна, слезная жидкость

An HPLC method for measuring proline and 4-hydroxyproline in human plasma, saliva and plaintive liquid (or tear) was validated. Biological samples were deproteinized using acetonitrile. Iminoacids derivatization was achieved with 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc-Cl) after blocking primary amino acids with orthophthaldialdehyde/2-mercaptoethanol. The derivatives were separated by reversed phase (C18) HPLC and fluorimetric detection at ex260-em330 nm. We are used columns Luna C18(2) (75 × 4.6 mm, 3 μm), Gemini C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm), both from Phenomenex and high-speed columns (100 × 4.6 mm) Chromolith Performance RP-18e from Merck. For screening on hyperprolinemia in newborn proposed separation method for high-speed columns with monolithic sorbent Chromolith Performance RP-18e. Simplicity, reproducibility and high sensitivity of a method, allow its use in a clinical practice for an estimation of biochemical changes at eye and stomatologic diseases and also for screening on congenital hyperprolinemia at newborn.

Keywords: HPLC, Fluorimetric detection, proline, 4-hydroxyproline, plasma, saliva, plaintive liquid (tear)

Введение

Пролин и его метаболит 4-гидроксипролин, входят в состав коллагена – основного белка соединительной ткани и потому клинический анализ является важным в диагностике заболеваний, связанных с патологией коллагена [1,2].

Помимо этого, анализ пролина и его метаболита незаменим в диагностике врожденных нарушений метаболизма аминок- и иминокислот, в частности, гиперпролинемии 1 и 2 типа, а также иминоглицинурии [3].

Известно достаточно много методов анализа аминок- и иминокислот в виде производных после реакции с дериватизационными реагентами [4]. Возможна неизбирательная дериватизация с помощью фенилизотиоцианата и УФ детекцией при 254 нм. Такой подход был использован при анализе гидроксипролина в экстрактах тканей и растворах коллагена [5]. Однако в настоящее время чаще используется избирательная химическая дериватизация иминокислот. Принцип ее заключается в следующем: вначале проба обрабатывается реагентом, селективно реагирующим с первичными аминокгруппами и после этого – реагентом, который вступает в реакцию как с первичными (которые уже "прикрыты"), так и с вторичными аминокгруппами. Этот принцип был разработан [6]: первичные аминокгруппы блокировали путем реакции с ортофталевым альдегидом, а затем обрабатывали вторичные флюоренилметилхлороформатом (Fmoc-Cl). Обе реакции протекают при комнатной температуре. Весь процесс, включая экстракцию и дериватизацию, занимает меньше 5 мин, а полученные Fmoc-производные иминокислот химически очень стабильны. Этот принцип лежит в основе большинства аналитических методов: первичные аминокгруппы блокируют ортофталевым альдегидом, а затем дериватизации подвергают вторичные аминокгруппы пролина и гидроксипролина разными реагентами – фенилизотиоцианатом [7], дабсил хлоридом [8], 4-(5,6-диметокси-2-фталимидинил) фенилсульфонил хлоридом [9], однако, в большинстве случаев используют флюоренилметилхлороформат или Fmoc-Cl [1, 10-12].

В нашем исследовании был модифицирован метод [1] и проведена его адаптация к анализу пролина и 4-гидроксипролина в плазме/сыворотке крови, слюне и слезной жидкости.

Эксперимент

Стандарты и реактивы. Базовые стандарты транс-4-гидрокси-L пролина (4-OH-Pro, Aldrich) и L-пролина (Pro, Fluka) готовили на 0.01 Н HCl в концентрации 1 мг/мл и хранили в холодильнике при 4⁰C. Сохраняются до 6 месяцев. Ортофталевый альдегид (Fluka), 2-меркаптоэтанол (Sigma), флюоренилметилхлороформат (Fmoc-Cl, Fluka). Боратный буфер 0.4 М с рН 9.0 готовили растворением Na₂B₄O₇×10H₂O (ХЧ, "Реактив", Санкт-Петербург) и Н₃ВО₃ (Fluka) в дистиллированной воде в концентрациях 38 и 24.6 г/л, соответственно [13]. Смешивали 4 части первого раствора, 1 часть второго и полученный раствор разбавляли водой до 0.1 М. Цитратно-фосфатный буфер для элюента 0.02 М рН 4.6: 54 мл 0.1 М лимонной кислоты (Fluka) + 46 мл 0.2 М Na₂HPO₄ × 2H₂O (Fluka) [13] + 400 мл воды. Смешивали ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Испания) и полученный буфер в соотношении 35:65 (v/v¹) и дегазировали ультразвуком (Branson-2200, США). Дериватизационный реагент готовили по [1] с минимальными модификациями: 10 мг ортофталевого альдегида растворяли в 1 мл ацетонитрила и добавляли 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Хранили в темном месте при 4⁰C не более 3 дней. Fmoc-Cl, 2 мг/мл в ацетонитриле, сохраняется до 1 месяца в холодильнике при 4⁰C, однако, предпочтительней использовать свежеприготовленный.

¹ Volume/volume, т.е. объемные соотношения

Аппаратура и оборудование. Флюориметрический детектор RF-10AXL (Shimadzu, Япония), насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Япония), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа "Мультихром" версия 3.0 (Амперсанд, Москва). Колонки: Chromolith Performance RP-18e 100 × 4.6 мм с монолитным сорбентом, около 3000 ТТ² и защитной предколонкой 5 × 4.6 мм (Merck, Германия); Gemini 150 × 4.6 мм, C18, 5 мкм, около 11.000 ТТ (Phenomenex, США); Luna 75 × 4.6 мм, C18(2), 3 мкм, около 9500 ТТ (Phenomenex, США), обе с предколоночными фильтрами 0.5 мкм (Supelco, США). Флюориметрическая детекция ex260-em330 нм, чувствительность средняя (Sens=2, Gain=1). Вортекс Intelli-Mixer RM-1L, центрифуги CM-6M и CM-50 (Elmi, Латвия).

Биологический материал. Кровь забирали в гепаринизированные пробирки (vacutainer), центрифугировали 10 мин при 2000 rpm и отбирали 0.5 мл плазмы в 2-мл полипропиленовые пробирки с овальным дном. Если не проводилась немедленная обработка, плазму замораживали и хранили в холодильнике при -20^oC. Слюну собирали в 1.5-мл полипропиленовые пробирки и замораживали при -20^oC. Слезную жидкость в количестве 10-20 мкл отбирали нетравматичным аспиратором собственного изготовления с одноразовыми наконечниками и замораживали при -20^oC.

Обсуждение результатов

Депротенизация. К 1 части плазмы добавляли 2 части ацетонитрила, интенсивно перемешивали на вортексе в течение 2 мин (режим F8) и центрифугировали 2 мин при 10.000 rpm. Слюну оттаивали и центрифугировали на тех же режимах. Поскольку слюна представляет собой безбелковый ультрафильтрат плазмы крови, депротенизации не требовалось. Аналогичным образом поступали и со слезной жидкостью: ее объем просто доводили до 50 мкл дистиллированной водой. Для последующей дериватизации использовали по 50 мкл супернатантов. При анализе аминокислот в плазме крови лучшими депротенизаторами считаются ацетонитрил и 5-сульфосалициловая кислота [14]. Мы провели сравнение депротенизации плазмы ацетонитрилом и 5-сульфосалициловой кислотой (5-SSA) по известному методу [15]. Оказалось, что пик 4-гидроксипролина при депротенизации 5-SSA завышен в 3-4 раза. Потому в дальнейшем от кислотной депротенизации отказались и стали использовать для этой цели только ацетонитрил.

Дериватизация

Стандарты. Для плазмы: 1 мл смеси вода – ацетонитрил (1:2, v/v) + по 5 мкл 4-ОН-Pro и Pro (1 мкг/мл). Для дериватизации отбирали 50 мкл.

Для слюны и слезы: 1 мл воды + по 5 мкл 4-ОН-Pro и Pro (1 мкг/мл) и для дериватизации также отбирали 50 мкл.

Биопробы. Отбирали по 50 мкл супернатантов каждой биологической жидкости, добавляли 10 мкл 0.1 М боратного буфера с рН 9.0 и 5 мкл ортофталевого альдегида/2-меркаптоэтанола. Перемешивали и выдерживали 1 мин. Затем добавляли 10 мкл Fmoc-Cl, периодически перемешивая в течение 2 мин. В петлю инжектора вводили 7.5 мкл стандартов (=25 нг), 5 – 10 мкл экстракта плазмы

² Мы заведомо использовали "старую" колонку со сниженной эффективностью, отработавшую 1.5 года; первоначально заявленная эффективность фирмой-производителем – более 8500 ТТ.

(соответствует 0.00115 и 0.0023 мл) и 10 мкл слюны (соответствует 0.0025 мл). Для слезы минимальный объем микроинъекции 20 мкл. Типичные хроматограммы на рис. 1.

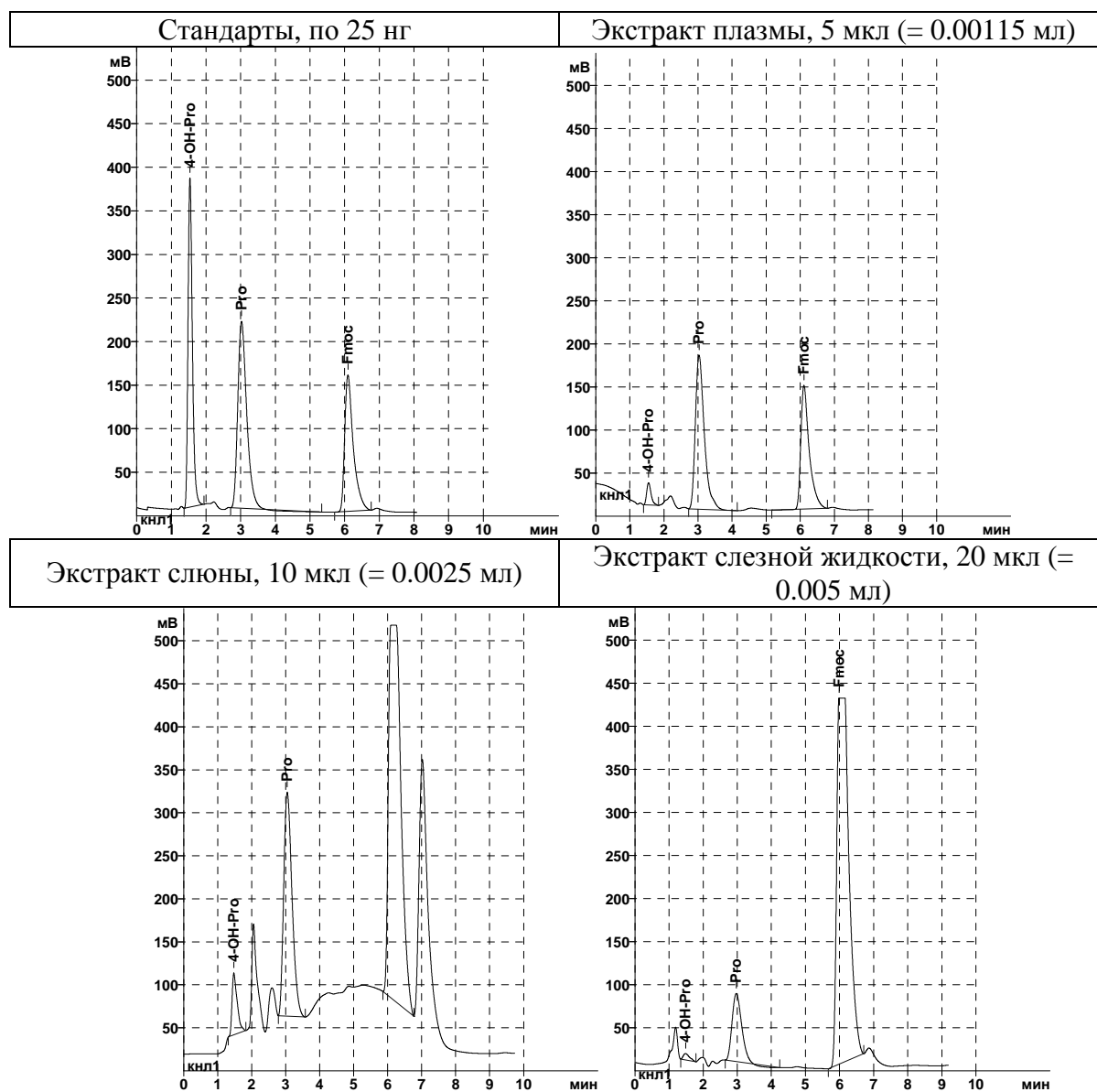


Рис. 1. Хроматограммы стандартов и экстрактов биологических жидкостей.

Колонка Chromolith 100 × 4.6 мм, Flu ex260-em330 нм (Sens=2, Gain=1).

Элюент – 35% ацетонитрила и 65% 0.02 М буфера с pH 4.6 (54:46), скорость потока 1400/мин, давление 28 бар. Fmoc – продукт гидролиза дериватизационного реагента (Fmoc-OH).

Максимальная концентрация пролина в плазме, минимальная – в слезной жидкости. Согласно литературным данным, концентрация пролина в плазме 20.4 ± 4.95 мкг/мл [9], по нашим данным 17.6 ± 5.2 мкг/мл ($n=78$). Концентрация 4-гидроксипролина в плазме гораздо меньше и составляет 1.46 ± 0.46 мкг/мл [9], по нашим данным 1.6 ± 0.6 мкг/мл ($n=78$). В слюне и слезной жидкости сохраняются сходные пропорции между пролином и 4-гидроксипролином. Максимальная концентрация 4-гидроксипролина в моче [1, 11].

После проведения дериватизационной реакции, экстракты некоторых биопроб начинают прогрессивно чернеть и мутнеют, особенно слюны. Процесс не связан с дериватизационными реагентами, поскольку стандарты в тех же условиях остаются прозрачными и иногда возникает легкая опалесценция. При этом дериваты аминокислот сохраняются в полном объеме и не забивают предколону. Интенсивное центрифугирование дериватов не устраняет проблемы. Существенно замедлить процесс можно разбавлением ортофталевого альдегида/2-меркаптоэтанола в 5-10 раз. Тем не менее, мы не рекомендуем выдерживать дериваты более 10 мин после проведения реакции.

При хроматографическом разделении экстрактов биопроб, возможны непреднамеренные ошибки. Это касается в первую очередь экстрактов слюны и 4-гидроксипролина при анализе на колонках с монолитным сорбентом (Chromolith) и на традиционной колонке (Gemini), что иллюстрируют представленные хроматограммы (рис. 2 и 3).

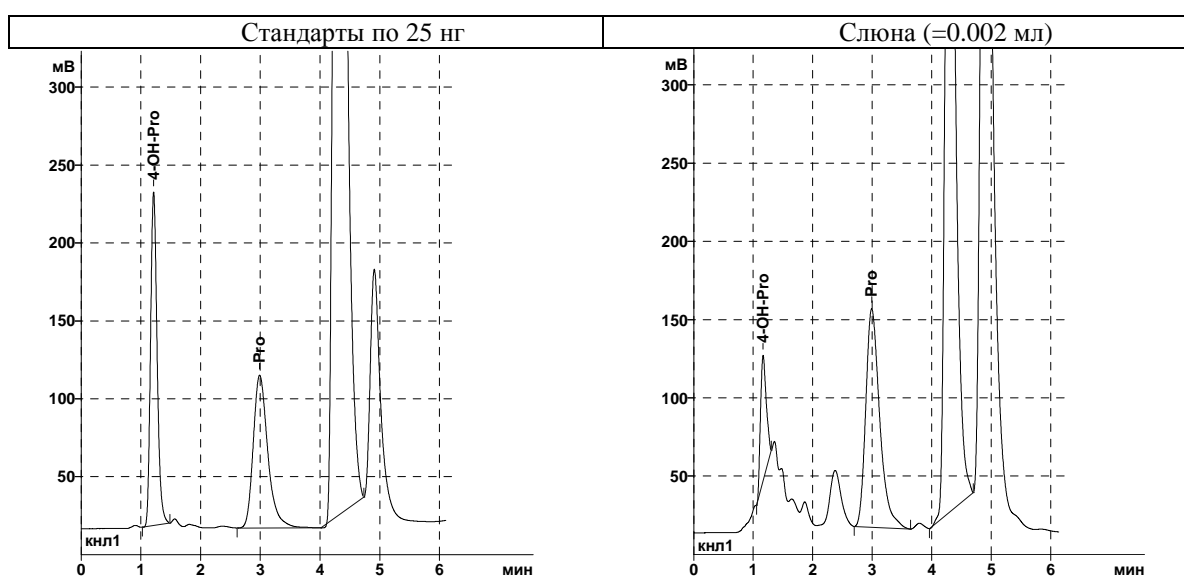


Рис. 2. Хроматограммы стандартов и экстракта слюны. Колонка Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 мм, Flu ex260-em330 нм (Sens=2, Gain=1), элюент 35% ацетонитрила и 65% 0.02 М цитратно-фосфатного буфера с pH 4.6, 2000 мкл/мин, 41 бар. Видны множественные пики эндогенных полярных веществ, мешающие идентификации 4-гидроксипролина

Аналогичные результаты получены на колонке Luna 75×4.6 мм, C18(2), 3 мкм, около 9500 ТТ (Phenomenex). Времена удерживания 4-ОН-Pro и Pro составили 2.3 и 8.4 мин, соответственно, при скорости потока 750 мкл/мин и давлении 72 бара. Таким образом, при анализе 4-гидроксипролина в слюне и слезной жидкости, желательно использовать традиционные высокоэффективные колонки (не менее 9000 ТТ). С хроматографическим разделением пролина проблем обычно не возникает и его анализ в плазме, слюне и слезной жидкости, возможен как на колонках с монолитным сорбентом, так и традиционных.

После дериватизации возможна промывка экстрактов диэтиловым эфиром [1], которая преследует две цели: во-первых, устраняется избыток дериватизационного реагента, во-вторых, за счет "ухода" ацетонитрила в эфир, экстракт концентрируется. Типичные хроматограммы на рис. 4.

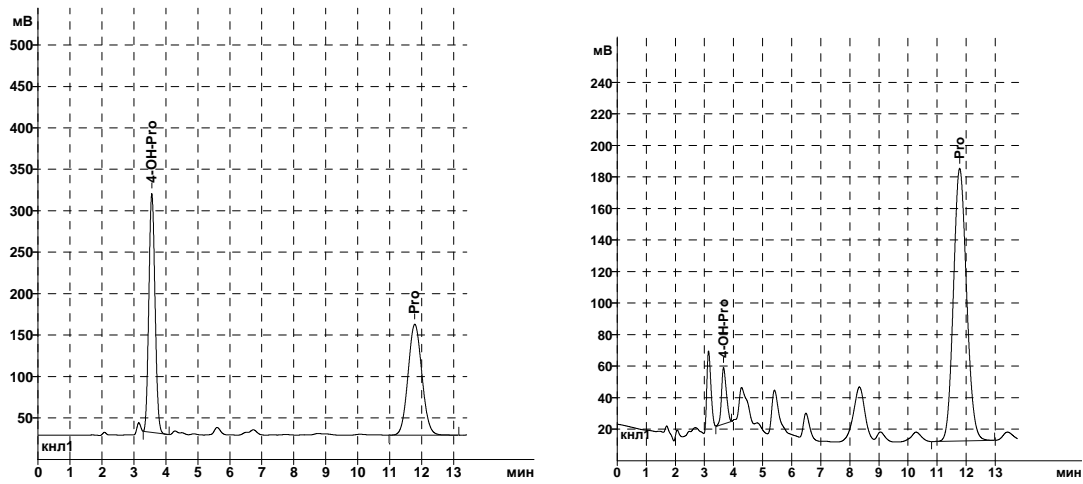


Рис. 3. Те же стандарты и тот же экстракт слюны при разделении на колонке Gemini 150 × 4.6 мм, C18, 5 мкм. Скорость потока 1000 мкл/мин, давление 76 бар. Остальные хроматографические условия как на рис. 2. Пик 4-гидроксипролина полностью отделен от эндогенных пиков и высота его заметно меньше

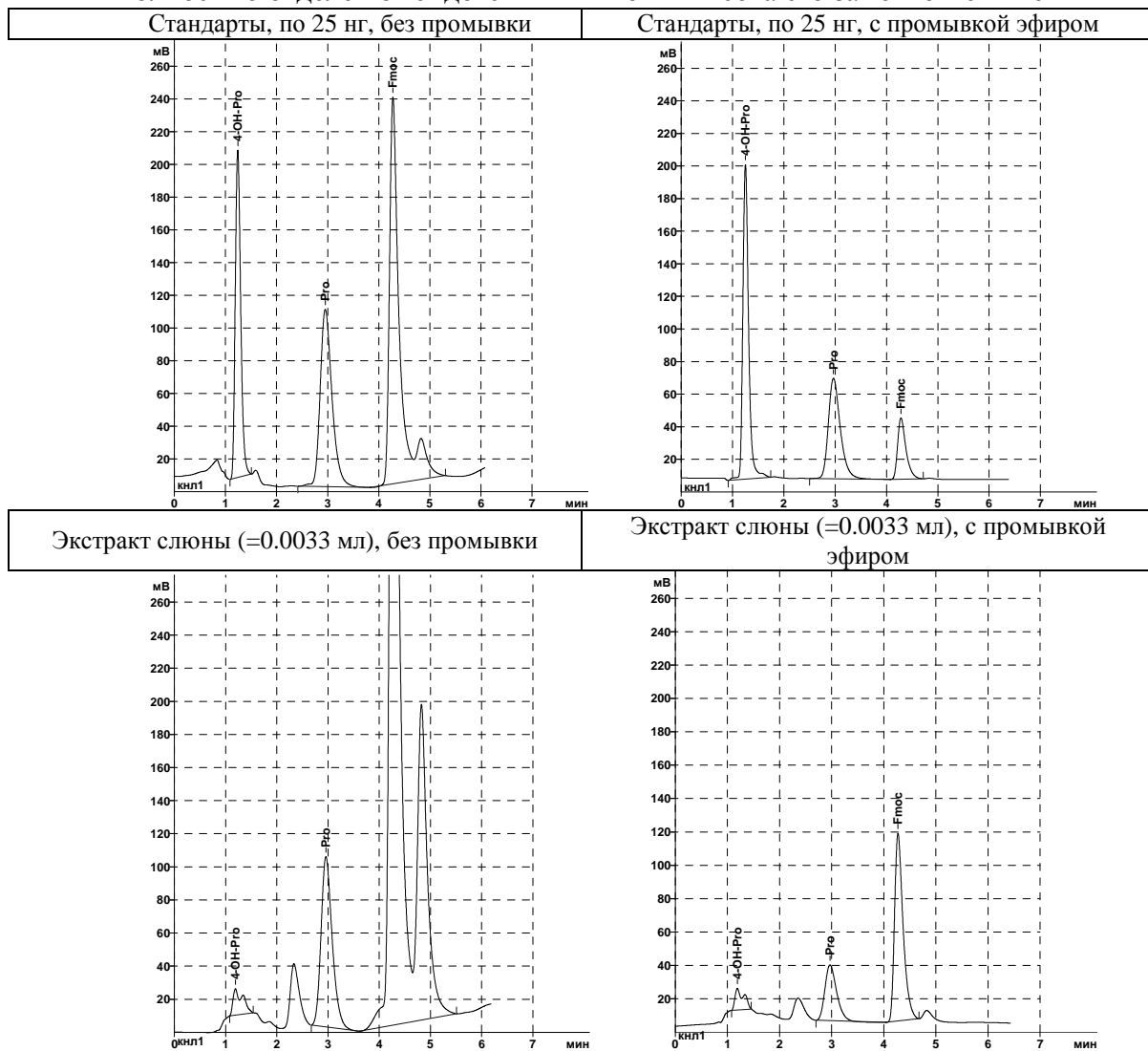


Рис. 4. Колонка Chromolith 100 × 4.6 мм, Flu ex260-em330 нм (Sens=2, Gain=1), 35% ацетонитрила и 65% 0.02 М цитратно-фосфатного буфера с рН 4.6, 2000 мкл/мин, 39 бар

Из представленных данных видно, что промывка диэтиловым эфиром в основном устраняет менее полярные соединения, в то время как полярные компоненты, включая 4-ОН-Pro, почти не теряются. Степень экстракции 4-ОН-Pro составила 85-96% (n=44), Pro – 40-65% (n=44). Этот вариант может быть использован, в основном для устранения избытка дериватизационного реагента. Следует иметь в виду, что при этом теряется примерно половина пролина (вместе с ацетонитрилом), а стандарты надо также промывать эфиром. Неполярные органические растворители (пентан и гексан) не влияют на чистоту экстрактов, а в этилацетат дериваты экстрагируются почти полностью.

Для оценки степени экстракции в качестве внутреннего стандарта использовали дегидропролин [1]. Однако на колонках Chromolith он неполностью разделяется с пролином ($\alpha=1.08$). На колонках Gemini 150 \times 4.6 мм разделение полное ($\alpha=1.18$, элюируется перед пролином). С учетом того, что стандарты и биопроба проходят идентичные экстракционные и дериватизационные процедуры, мы полагаем, что в использовании внутреннего стандарта особой необходимости нет.

Предел количественного обнаружения (LOQ) при соотношении сигнал/шум=10, составил 0.03 нг для 4-гидроксипролина и 0.05 нг для пролина на инъекцию при использовании традиционных колонок.

Простота, воспроизводимость и высокая чувствительность метода, позволяют его использование в клинической практике для оценки биохимических изменений при глазных и стоматологических заболеваниях, а также для скрининга на врожденную гиперпролинемию у новорожденных.

Список литературы

1. Teerlink T., Tavenier P., Netelenbos J.C. Selective determination of hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization. // *Clin. Chim. Acta.* 1989. V. 183(3). P. 309-315.
2. Badadani M., Babu S.V., Shetty K.T. Dinitrophenyl derivatization of imino acids, spectral characteristics and HPLC analysis: application in urinary peptide-derived hydroxyproline and proline assay. // *Ann. Clin. Biochem.* 2007. V. 44(2). P. 164-172.
3. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н. Тица. Пер. с англ. М.: Лабинформ. 1997. 960 С.
4. George Lynn and Louise C. Hellwig. Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons. Inc. 1998.
5. Green G.D., Reagan K. Determination of hydroxyproline by high pressure liquid chromatography. // *Anal Biochem.* 1992. 201(2). P. 265-269.
6. Einarsson S. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 348. P. 213-220.
7. Yaegaki K., Tonzetich J., Ng A.S. Improved high-performance liquid chromatography method for quantitation of proline and hydroxyproline in biological materials. // *J. Chromatogr.* 1986. V. 356(1). P. 163-170.
8. Ikeda M., Sorimachi K., Akimoto K., Yasumura Y. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of hydroxyproline and proline from collagen by derivatization with dabsyl chloride. // *J. Chromatogr.* 1993. V. 621(2). P. 133-138.
9. Inoue H., Moritani K., Date Y., Kohashi K., Tsuruta Y. Determination of free hydroxyproline and proline in human serum by high-performance liquid chromatography

using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)phenylsulfonyl chloride as a pre-column fluorescent labelling reagent. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 2001. V. 757(2). P. 369-373.

10. Nathans G.R., Gere D.R. Rapid robust separation of hydroxyproline and proline. // Anal. Biochem. 1992. V. 202(2), P. 262-267.

11. Castelain S., Kamel S., Picard C., Desmet G., Sebert J.L., Brazier M. A simple and automated HPLC method for determination of total hydroxyproline in urine. Comparison with excretion of pyridinolines. Clin. Chim. Acta. 1995. V. 235(1). P. 81-90.

12. Hutson P.R., Crawford M.E., Sorkness R.L. Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue samples. // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003. V. 791(1-2). P. 427-430.

13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир. 1991. 544 с.

14. Fekkes D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of aminoacids in physiological samples (review). // J. Chromatogr. B. 1996. V. 682. P. 3-22.

15. Hubbard R.W., Chambers J.G., Sancher A. Amino acid analysis in plasma: studies in sample preparation. // J. Chromatogr. 1988. V. 431. P. 163-169.

Дутов Алексей Александрович - д.м.н. (клиническая фармакология), врач высшей квалификационной категории (клиническая лабораторная диагностика), с.н.с. лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии научно-исследовательского института медицинской экологии при Медицинской Академии, Чита.

Никитин Денис Александрович - заведующий лабораторией химического анализа Забайкальского государственного университета, Чита

Мищенко Мария Николаевна - к.м.н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии Читинской Медицинской Академии

Семенова Анастасия Николаевна - аспирант кафедры хирургической стоматологии 3-го года обучения Читинской Медицинской Академии

Мартынова Анастасия Владимировна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Сверкунова Анна Викторовна - аспирант кафедры химии 1-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Федорова Екатерина Николаевна - аспирант кафедры химии 3-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Dutov Alexei A - MD (clinical pharmacology), physician of the highest qualifying category (clinical laboratory diagnostics), Senior Research Fellow Laboratory of Experimental and Clinical Biochemistry and Immunology, Research Institute of Medical Ecology of the Medical Academy, Chita. e-mail: dutovaa@yandex.ru

Nikitin Denis A - head of the laboratory of chemical analysis of the Zabaikalsky State University, Chita, e-mail: nikitinnd@gmail.com

Mishchenko Maria N - cand. sci. med., assistant Department of Dentistry, Medical Academy, Chita

Semenova Anastasia N - post-graduate student Surgical Dentistry 3th year of study Medical Academy, Chita

Martynova Anastasia V - post-graduate student Department of Chemistry 1th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Sverkunova Anna V. - post-graduate student of chemistry 1th-year learning the Zabaikalsky State University, Chita

Fedorova Ekaterina N - post-graduate student Department of Chemistry, 3th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Коновалова Ольга Николаевна, аспирант кафедры химии 3-года обучения Забайкальского Государственного Университета

Лукьянова Юлия Львовна - врач-ординатор кафедры неврологии Читинской Медицинской Академии

Ермолина Алена Владимировна - врач офтальмолог Краевой больницы № 2

Пинелис Иосиф Семенович - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургической стоматологии Читинской Медицинской Академии

Konovalova Olga N. - post-graduate student Department of Chemistry, 3th-year training Zabaikalsky State University, Chita

Lukyanova Julia L - a physician ordinator Department of Neurology, Medical Academy, Chita

Yermolina Alena V - physician ophthalmologist Regional Hospital № 2, Chita

Pinelis Joseph S - MD, professor, head of dental surgery Medical Academy, Chita