

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **23647**

(13) **С1**

(46) **2022.02.28**

(51) МПК

**G 01N 30/02** (2006.01)

**G 01N 33/48** (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА И ДРУГИХ  
ТИОЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ**

(21) Номер заявки: а 20190371

(22) 2019.12.20

(43) 2021.08.30

(71) Заявитель: Учреждение образования  
"Гродненский государственный ме-  
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Новгородская Яна Иоси-  
фовна; Дорошенко Евгений Михай-  
лович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение  
образования "Гродненский госу-  
дарственный медицинский универ-  
ситет" (ВУ)

(56) ДОРОШЕНКО Е.М. и др. Структура  
пула свободных аминокислот и их  
производных плазмы крови у пациен-  
тов с ишемической болезнью сердца и  
проявлениями хронической сердечной  
недостаточности. Журнал Гродненско-  
го государственного медицинского  
университета, 2017, т. 15(5), с. 551-556.  
RU 2121001 С1, 1998.

НАУМОВ А.В. и др. Определение го-  
моцистеина методом ВЭЖХ с предко-  
лоночной дериватизацией в микро-  
объемах биологических жидкостей.  
Сборник тезисов докладов Республи-  
канской научной конференции по ана-  
литической химии с международным  
участием "Аналитика РБ-2010". Минск,  
2010, с. 138.

(57)

Способ определения гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона в животных тканях, при котором осуществляют пробоподготовку, при этом в среду для гомогенизации предварительно вносят трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид и N-ацетилцистеин в качестве внутреннего стандарта, затем добавляют в пробу раствор трихлоруксусной кислоты, пробу центрифугируют, в полученный супернатант вносят аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонат для дериватизации тиолов, полученную смесь инкубируют, нейтрализуют и осуществляют ее анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием по флуоресценции в режиме градиентного элюирования с изократическим этапом в начале разделения, при этом разделение осуществляют на колонке, содержащей обращенно-фазовый сорбент, допускающий работу с нулевой концентрацией органического модификатора, с использованием фосфатного буфера с величиной рН ниже 3,5, после чего определяют концентрацию целевых соединений методом внутреннего стандарта.

Изобретение относится к биохимии и может быть использовано для определения гомоцистеина и других низкомолекулярных серосодержащих соединений в животных тканях в лабораторных биохимических исследованиях.

Известен способ определения цистеина, гомоцистеина, глутатиона в мозге, легких, сердце, почках, эритроцитах и плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией [1].

Однако гомоцистеин был уверенно обнаружен только в мозге, плазме и эритроцитах, предположено, что в других тканях он находился ниже предела обнаружения данного метода. Авторы не восстанавливали дисульфиды, что не дает возможности судить о полной концентрации соответствующих тиолов, так как существенная часть аналитов будет присутствовать в виде смешанных дисульфидов, существенно усложняя интерпретацию результатов.

Известен способ определения гомоцистеина, цистеина, глутатиона и N-ацетилцистеина в мозге свиньи методом ион-парной ВЭЖХ на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектированием [2]. Метод основан на восстановлении дисульфидных связей трис-(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлоридом и предколоночной дериватизации свободных тиоловых групп тетрафторборатом 2-хлор-1-метилхинолиния.

Метод имеет недостаточную чувствительность для корректного детектирования гомоцистеина в тканях, кроме этого, ультрафиолетовое детектирование ограничивает разрешающую способность метода из-за присутствия пиков интерферирующих соединений.

Известен способ определения гомоцистеина в печени, почках, мозге, сердце, легких и селезенке мышей и крыс радиометрическим методом в сочетании с ВЭЖХ [3]. При осуществлении способа сначала проводили адсорбцию аденозина и S-аденозилгомоцистеина (AdoHcy) в экстракте ткани на уголь, покрытый декстраном, при этом Hcy оставался в растворе. Затем Hcy конденсировался с радиоактивным аденозином, а метка AdoHcy количественно определялась с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой.

Недостатком способа является его высокая сложность и трудоемкость, необходимость сбора фракций для последующего детектирования по радиоактивности.

Все вышеперечисленные хроматографические методы имеют ограничения с точки зрения стоимости и доступности оборудования, реагентов, сложности процедур, длительности процедуры, что затрудняет их использование в биохимических исследованиях. Однако основным ограничением является разрешающая способность методов, которая не позволяет использовать их для проб тканей, так как спектр соединений родственной структуры в тканях значительно шире, чем в биологических жидкостях.

Наиболее близким к заявляемому является способ определения гомоцистеина (Hcy) в биологических жидкостях [4]. Данный способ основан на обращенно-фазной ВЭЖХ после предколоночной дериватизации тиолов с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F) с изократическим элюированием. Для восстановления тиолов из дисульфидов и высвобождения связанных с белками тиолов используется трис-(карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР). Пробы плазмы крови смешивали с 10 мкл 0,5 мМ раствора N-ацетилцистеина (НАС) (внутренний стандарт) и 5 мкл раствора ТСЕР (100 мг/мл), оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Белки осаждали добавлением 50 мкл 10 %-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробы центрифугировали при 4 °С 15 мин при 16000 g. Для дериватизации в микропробирку на 200 мкл, содержащую 2 мкл 1,55 М NaOH, 12,5 мкл 0,125 М Na-боратного буфера (pH 9,5), содержащего 200 мг/л ЭДТА и 5 мкл раствора SBD-F в таком же буфере, вносили 10 мкл супернатанта. Полученную смесь инкубировали 1 ч при 60 °С. Разделение осуществляли на сорбенте Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (размер частиц 3,5 мкм). Подвижная фаза: 0,05 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,5 мМ СН<sub>3</sub>COOH, pH 3,65, 40 мг/л ЭДТА, 1,8 % ацетонитрила. Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 25 °С. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм.

Однако применение этого способа для определения гомоцистеина в тканях с использованием вышеприведенных условий хроматографического разделения, оптимизированных для плазмы крови, невозможно ввиду интерференции пиков неизвестных компонентов пробы и пика гомоцистеина.

Задача изобретения - разработка способа определения гомоцистеина одновременно с возможно более широким кругом других тиолсодержащих соединений (цистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона) в животных тканях.

## BY 23647 C1 2022.02.28

Поставленная задача решается тем, что осуществляют пробоподготовку, при этом в среду для гомогенизации предварительно вносят трис(2-карбоксиил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР) и N-ацетилцистеин в качестве внутреннего стандарта, затем добавляют в пробу раствор трихлоруксусной кислоты, пробу центрифугируют, в полученный супернатант вносят аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонат (SBD-F) для дериватизации тиолов, полученную смесь инкубируют, нейтрализуют и осуществляют ее анализ методом ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции в режиме градиентного элюирования с изократическим этапом в начале разделения, при этом разделение осуществляют на колонке, содержащей обращенно-фазовый сорбент, допускающий работу с нулевой концентрацией органического модификатора, с использованием фосфатного буфера с величиной рН ниже 3,5, после чего определяют концентрацию целевых соединений методом внутреннего стандарта.

Способ осуществляют следующим образом. Гомогенаты готовят из замороженных тканей с использованием 0,15 М калий-фосфатного буфера (рН = 7,4) в соотношении 1:5. При этом ТСЕР и 0,2 % раствора НАС предварительно добавляют в этот буфер. Гомогенаты оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Тем самым объединяются этапы получения гомогената, восстановления тиолов и добавления внутреннего стандарта, предотвращается окисление тиолов при гомогенизации и снижается вероятность внесения ошибки на этапе добавления внутреннего стандарта. Через 30 мин осаждают белки добавлением к пробам 10 %-го раствора ТХУ в соотношении 1:1. Затем пробы центрифугируют при 4 °С 15 мин при 16000 g. В супернатанте после центрифугирования проводят дериватизацию тиолов. Для дериватизации готовят смесь, содержащую 100 мкл 1,55 М NaOH, 650 мкл 0,125 М Na-боратного буфера (рН 9,5) и 260 мкл свежеприготовленного раствора SBD-F (1 мг/мл) в таком же буфере. К 39 мкл этой смеси добавляют 20 мкл супернатанта после осаждения белков. Полученную смесь инкубируют 1 ч при 60 °С, затем смесь нейтрализуют добавлением 40 мкл 0,2 М раствора хлорной кислоты. Объемы растворов, используемые при приготовлении смеси для дериватизации, могут изменяться при условии сохранения соотношений между ними. В хроматографическую систему вводят 20 мкл реакционной смеси и проводят анализ. Условия хроматографического анализа: для определения используют колонки с сорбентом Zorbax SB C<sub>18</sub> (размер частиц 3,5 мкм) или другим сорбентом, позволяющим пользоваться низкими или нулевыми концентрациями органического модификатора и устойчивым к величинам рН подвижной фазы от 2. Для выполнения анализа необходимо, чтобы эффективность была не менее 20000 теоретических тарелок, для этого используют две колонки 2,1×150 мм в тандемном включении. Состав подвижной фазы: 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17,4 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 40 мг/л ЭДТА (А), ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (В). Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 29 °С. Профиль градиента: 0 мин - 0 % В, 26 мин - 0 % В, 47 мин - 15 % В, 53 мин - 25 % В. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм. Обработка хроматограмм и определение концентраций - по методу внутреннего стандарта. Калибровка системы осуществляется с помощью смеси стандартов, с которой проводят все этапы пробоподготовки и анализа, как с образцами ткани. Такую процедуру проводят с каждой серией определений.

Использование в начале хроматографического разделения изократического этапа (Na-фосфатный буфер без органического модификатора) позволяет достичь существенно большего удерживания пика H<sub>су</sub>, что важно для обеспечения разрешения пиков с пиками интерферирующих соединений, и обеспечить высокую эффективность разделения (малую ширину пиков). Удовлетворительное разрешение пика H<sub>су</sub> от интерферирующих пиков в данных условиях достигается при применении 0,1 М Na-фосфатного буфера с величиной рН ниже 3,5 (доводится добавлением ортофосфорной кислоты) и применением медленно-го градиента ацетонитрила.

Использование изократического элюирования на протяжении всего анализа невозможно, так как время удерживания внутреннего стандарта в этом случае значительно превышает 1 ч.

# BY 23647 C1 2022.02.28

Для подтверждения надежности определения гомоцистеина данным способом в отдельной серии опытов нами был определен аналитический выход гомоцистеина с использованием метода добавления стандарта. Пробу печени делили на 2 части, к одной из которых в среду для гомогенизации добавляли смесь стандартов цистеина, гомоцистеина и глутатиона в концентрации, соответствующей 50 нмоль/г ткани, к другой - эквивалентное количество воды.

Аналитический выход определяли как разность полученных уровней веществ в обеих частях пробы, которую сравнивали с калибровочной кривой с учетом внутреннего стандарта и выражали в процентах от добавленного количества.

Аналитический выход составил ( $n = 10$ ): для цистеина -  $97,3 \pm 15,1$  %; для гомоцистеина -  $103,7 \pm 4,9$  %; для глутатиона -  $95,5 \pm 14,0$  %. Это означает, что в процессе пробоподготовки не происходит существенных потерь аналитов и уровни гомоцистеина, определенные нами, корректны.

## Пример.

Введение суспензии метионина в суммарной суточной дозе 3 г/кг в течение 21 сут. приводит к возникновению гипергомоцистеинемии. Уровень Нсу в плазме крови крыс опытной группы составил 36,28 (32,29; 226,60) против 9,48 (8,05; 10,80) мкМ в контроле. По предлагаемой формуле определили уровни гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона в печени крыс (таблица).

### Уровни цистеина, гомоцистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона (среднее $\pm$ ср. ошибка среднего) в печени крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Концентрация (нмоль/г)	Контроль ( $n = 9$ )	Метионин ( $n = 8$ )
цистеин	286,71 $\pm$ 54,697	246,413 $\pm$ 19,3549
гомоцистеин	1,31 $\pm$ 0,214	10,281 $\pm$ 4,2754
цистеинилглицин	82,02 $\pm$ 8,509	88,798 $\pm$ 6,1309
гамма-глутамилцистеин	28,79 $\pm$ 4,099	40,806 $\pm$ 3,8252
глутатион	1715,37 $\pm$ 152,077	3019,928 $\pm$ 277,5148

На фиг. 1 представлена хроматограмма стандартов гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона при экспериментальной гипергомоцистеинемии для их определения в печени.

На фиг. 2 представлена хроматограмма общего гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона при экспериментальной гипергомоцистеинемии для их определения в печени.

На фиг. 3 та же хроматограмма, что и на фиг. 2, в более крупном масштабе. Отчетливо виден пик гомоцистеина (Нсу).

Предлагаемый способ определения гомоцистеина и других тиолсодержащих соединений в тканях, в отличие от метода-прототипа и других имеющихся в литературе методов, позволяет:

наряду с гомоцистеином одновременно детектировать цистеин, цистеинилглицин, гамма-глутамилцистеин, глутатион;

минимизировать потери аналита за счет восстановления тиолов очень мощным восстановителем (ТСЕР) непосредственно при приготовлении гомогената;

не использовать в пробоподготовке реакций с участием аналитов, катализируемых ферментами (SAH-гидролаза);

не использовать радиоактивные метки;

основные аналитические характеристики (разрешающая способность, воспроизводимость, чувствительность) обеспечиваются только характеристиками используемого аналитического оборудования, а не манипуляциями на этапе пробоподготовки;

вносить внутренний стандарт на раннем этапе пробоподготовки, что позволяет минимизировать основную часть ошибок пробоподготовки и анализа.

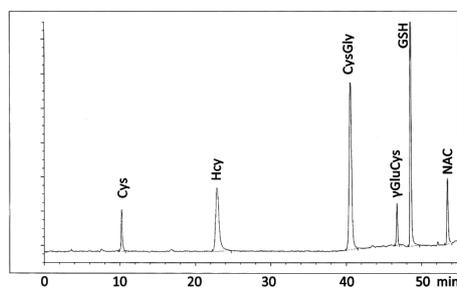
Источники информации:

1. GUAN X.A et al. Simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, v. 31, p. 251-261.

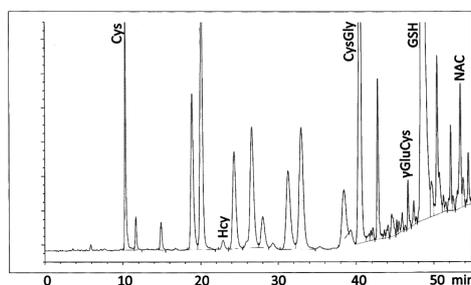
2. KAMIŃSKA A. et al. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. *J. Sep. Sci.*, 2018, v. 41, № 16, p. 3241-3249.

3. UELAND P.M. et al. Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 4, p. 2360-2364.

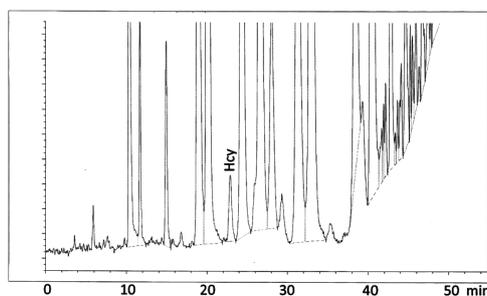
4. ДОРОШЕНКО Е.М. и др. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 2017, т. 15, № 5, с. 551-556.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3