



АНАЛИЗ ЛИПОФИЛЬНЫХ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕНГМЮРА

Гладчук А.С.^{1,2}, Иванова Д.Н.³, Бабенко Д.И.³, Гафт С.С.¹, Александрова М.Л.¹, Суходолов Н.Г.^{2,4}, Подольская Е.П.^{1,4}

¹ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург

²СПбГУ, Санкт-Петербург

³СПбГТИ (ТУ), Санкт-Петербург

⁴ИАП РАН, Санкт-Петербург

ANALYSIS OF LIPOPHILIC HYDROXYL CONTAINING NATURAL COMPOUNDS VIA LANGMUIR TECHNOLOGY

Gladchuk A.S.^{1,2}, Ivanova D.N.³, Babenko D.I.³, Gaft S.S.¹, Alexandrova M.L.¹, Sukhodolov N.G.^{2,4}, Podolskaya E.P.^{1,4}

¹Golikov Research Center of Toxicology, Saint Petersburg

²SPbU, Saint Petersburg

³SPbSTI, Saint Petersburg

⁴IAI RAS, Saint Petersburg

Актуальность

К липофильным гидроксилсодержащим природным соединениям относится большое количество биологически активных веществ. Например, монокарбоновые гидроксикислоты, представителями которых являются желчные кислоты и некоторые фитогормоны (абсцизовая и жасмоновая кислоты). Известно, что желчные кислоты являются маркерами таких заболеваний, как холестаз любой этиологии. В то же время, абсцизовая и жасмоновая кислоты являются маркерами осмотического стресса у растений, который развивается в результате засухи или избыточной засоленности почв. Методики, использующиеся на сегодняшний день, требуют не только длительной многоступенчатой пробоподготовки, но и использования хромато-масс-спектрометрических методов анализа, которые также весьма затратны.

В связи с этим, существует необходимость разработки новых высокочувствительных и экспрессных методик для анализа липофильных гидроксилсодержащих природных соединений.

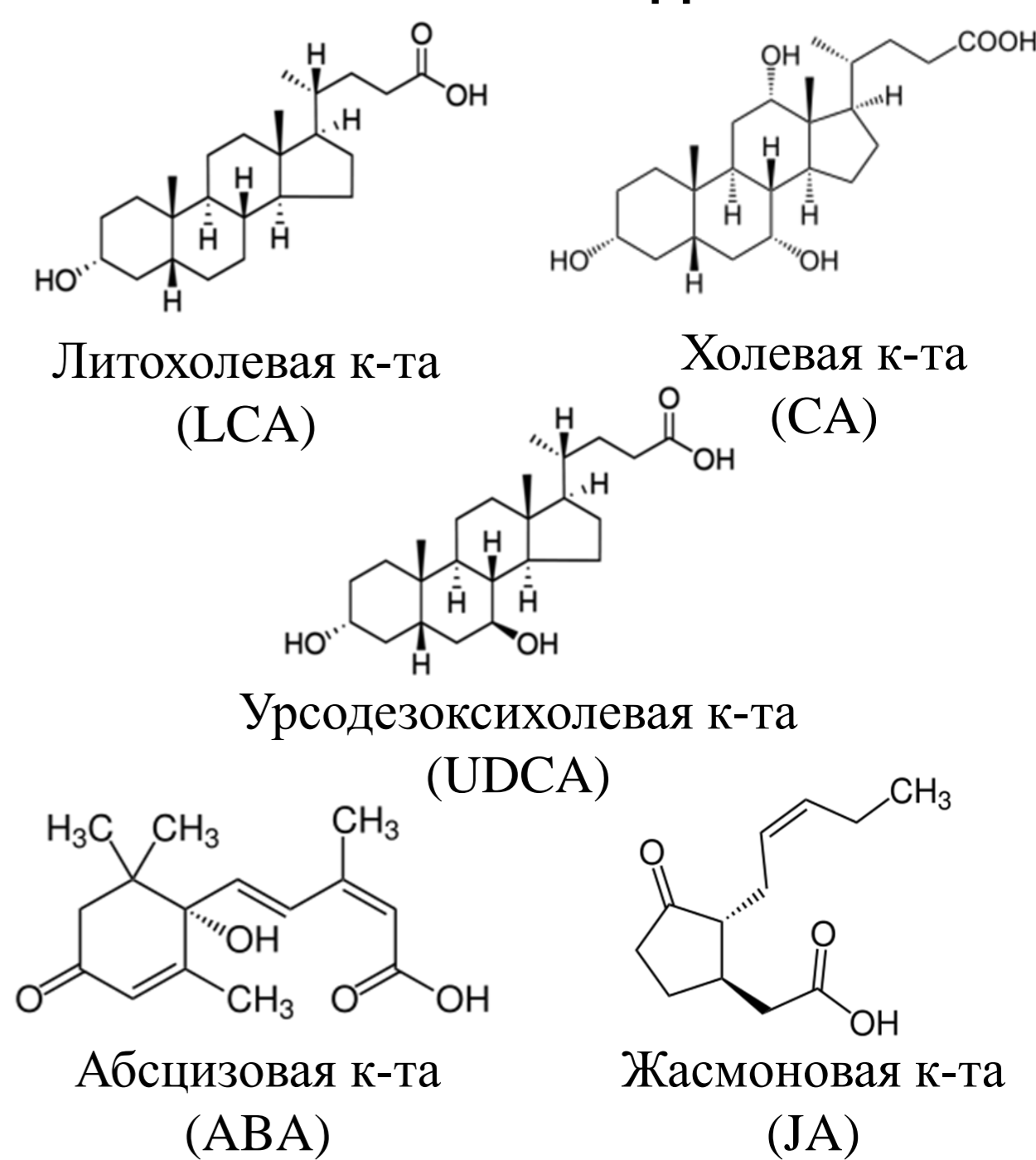
Цель и задачи работы

Цель работы – расширить область применения метода определения амфифильных соединений, основанного на технологии Ленгмюра, для анализа липофильных гидроксилсодержащих природных соединений.

Задачи:

- 1) Разработать методику осаждения тонких пленок липофильных гидроксилсодержащих природных соединений на примере гидроксилсодержащих монокарбоновых кислот для последующего их МАЛДИ-МС анализа в виде монокарбоксилатов бария.
- 2) Определить пределы обнаружения для стандартов желчных кислот, абсцизовой и жасмоновой кислот.
- 3) Разработать методы экстракции желчных кислот, абсцизовой и жасмоновой кислот из биологических образцов.
- 4) Произвести апробацию предложенного подхода для анализа состава желчных кислот, абсцизовой и жасмоновой кислот в экстрактах из биологических образцов.

Объекты исследования



Методика анализа с использованием технологии Ленгмюра

Приготовление стоковых растворов стандартов аналитов в изопропанол, затем приготовление последовательных разбавлений н-гексаном

Нанесение на ячейку МАЛДИ мишени 0,6 мкл водной субфазы (водный раствор смеси ацетата бария (0,25 мг/мл) и 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (DHB, 0,25 мг/мл))

Нанесение на поверхность водной субфазы 0,6 мкл раствора аналитов в смеси изопропанол/н-гексан

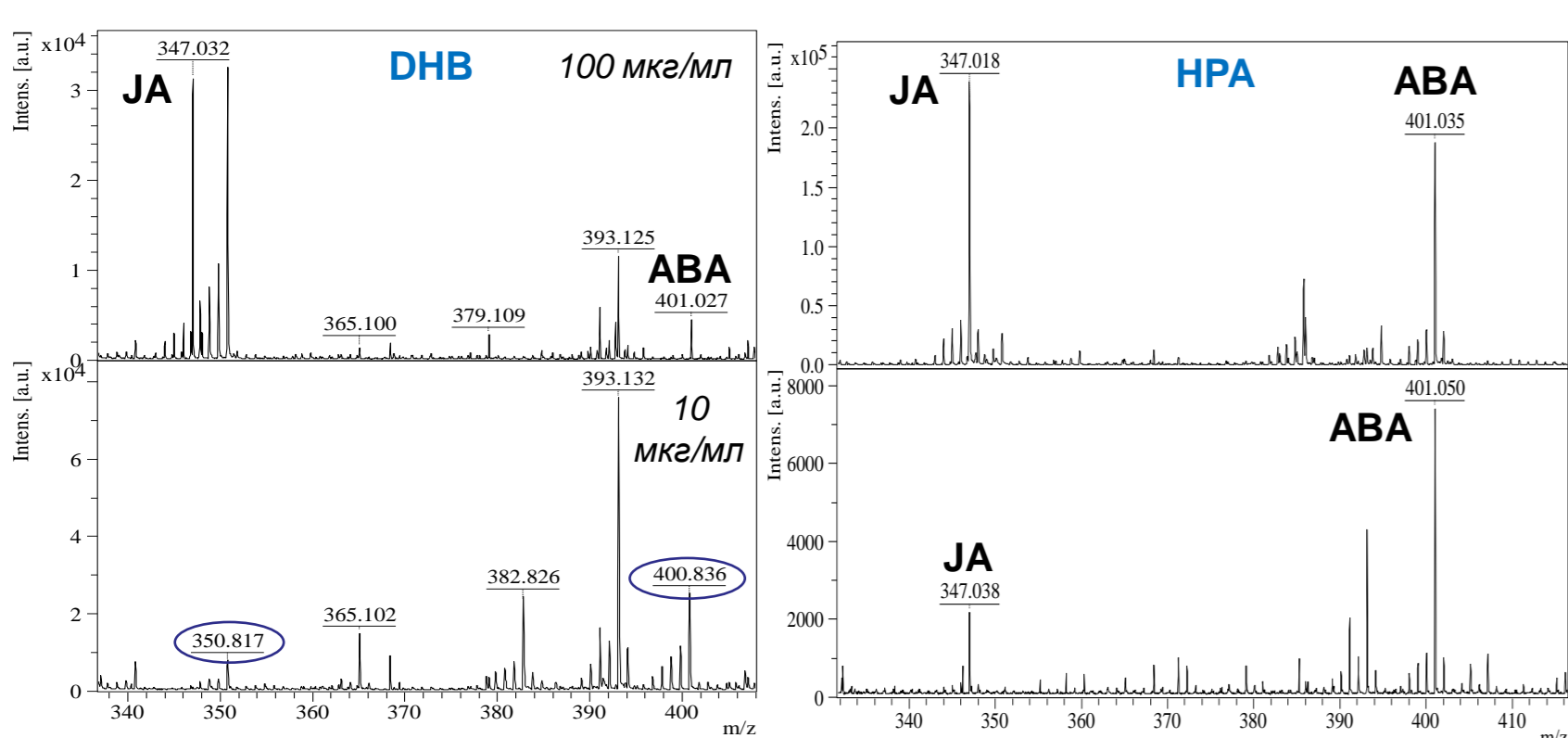
Испарение водной и органической фаз

Нанесение на поверхность водной субфазы 2 мкл 90% водного ацетонитрила

МАЛДИ-МС анализ

Результаты анализа фитогормонов

При исследовании фитогормонов (ABA и JA) использовали тот же подход, что и в случае желчных кислот. Однако при МАЛДИ-МС анализе возникло затруднение с регистрацией сигналов $[M-H+Ba]^+$ ионов ABA и JA при концентрациях меньше 100 мкг/мл: в масс-спектре в диапазонах m/z , соответствующих искомым соединениям (m/z 401,03 для ABA; m/z 347,03 для JA) присутствовали интенсивные сигналы матрицы DHB (m/z 350,82 и m/z 400,84), на фоне которых при использовании масс-спектрометра с разрешением около 10000 невозможно было однозначно обнаружить целевые аналиты. В связи с этим процедура пробоподготовки потребовала внесения изменений: в качестве матрицы вместо DHB была использована другая водорастворимая кислота – 3-гидроксициколиновая кислота (HRA). При использовании этой матрицы в качестве добавки к водному раствору ацетата бария сигналы $[M-H+Ba]^+$ ионов ABA и JA были надежно детектированы в масс-спектре, поэтому при дальнейшем анализе фитогормонов использовали HRA в качестве матрицы.

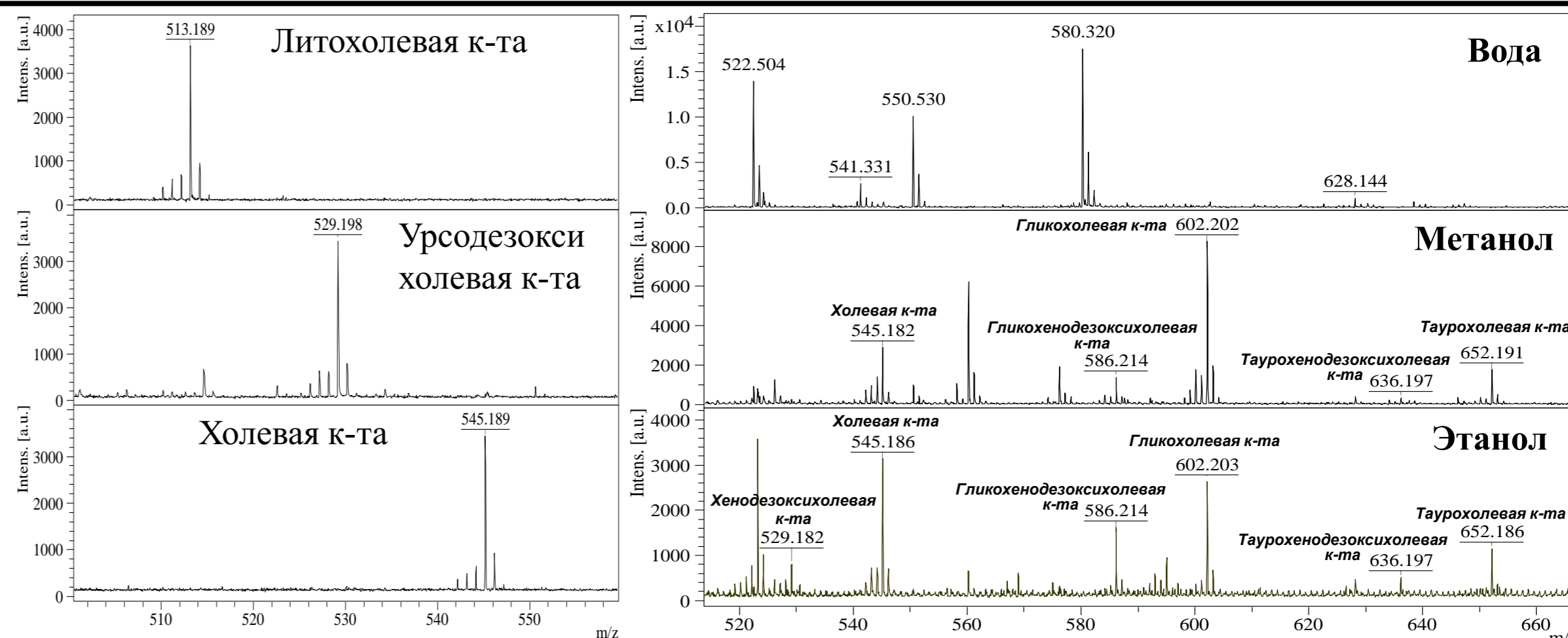


Результаты анализа желчных кислот

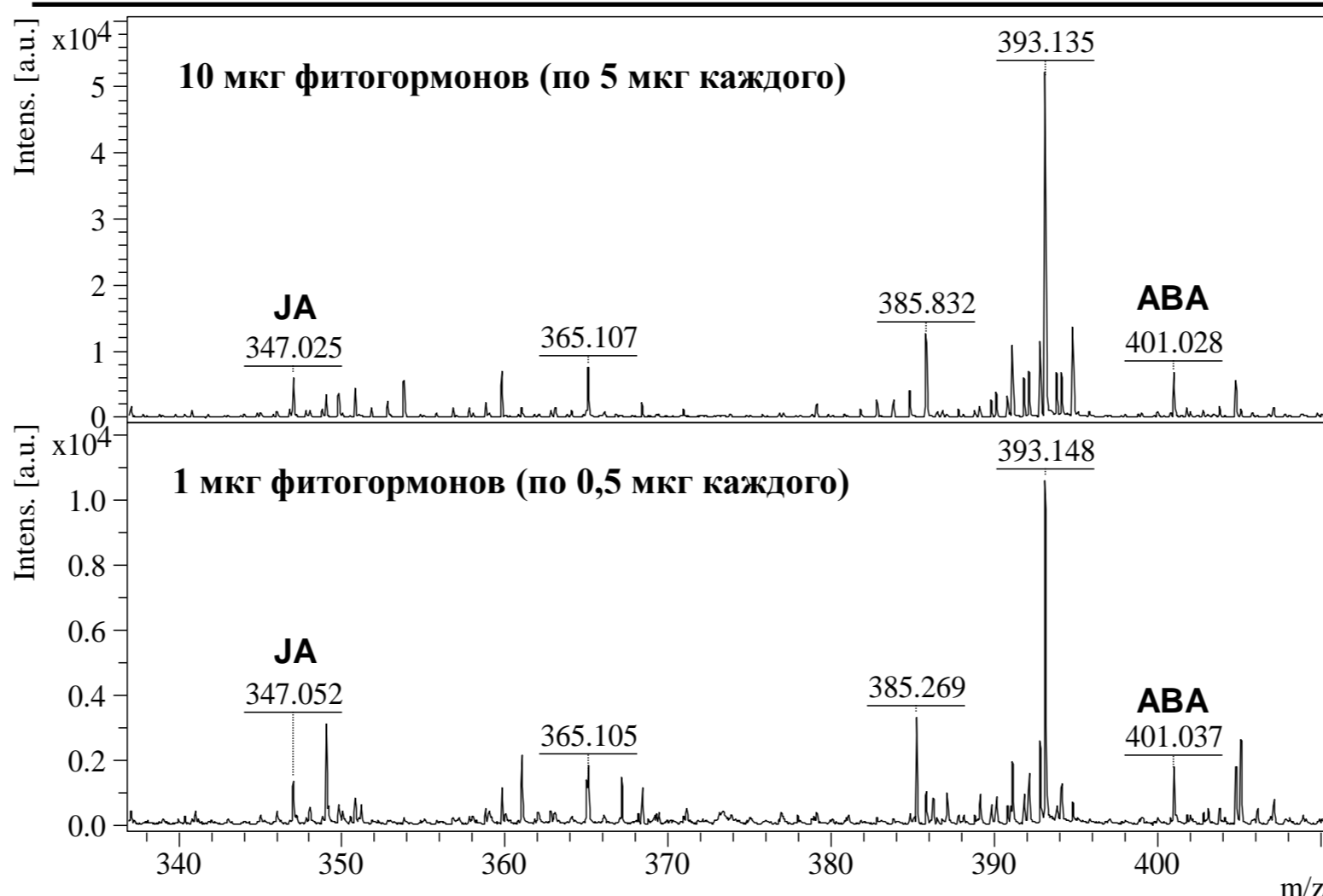
В масс-спектрах надежно регистрируются сигналы, соответствующие бариевым солям трех желчных кислот. Сигналы $[M-H+Ba]^+$ ионов трех желчных кислот были идентифицированы, как по значению m/z (LCA – m/z 513,19; UDCA – m/z 529,20; CA – m/z 545,19), так и по наличию у них характерного изотопного распределения.

Пределы обнаружения:

- LCA – 300 фмоль (113 пг) на мишени
- UDCA – 1,5 пмоль (589 пг) на мишени
- CA – 300 фмоль (123 пг) на мишени



Для апробации предложенного подхода нами было проведено исследование многокомпонентного биологического образца – сухой желчи, выделенной из быка и овцы. Желчь обрабатывали растворителями, которые не смешиваются с н-гексаном: водой, метанолом и этанолом. Затем экстракцию из водных и спиртовых растворов проводили н-гексаном. В случае экстракции из водного раствора, в масс-спектрах сигналы, соответствующие желчным кислотам, обнаружены не были. В случае использования в качестве растворителей метанола и этанола были идентифицированы холевая (m/z 545,18) и хенодезоксихолевая (m/z 529,18) кислоты, а также их конъюгаты с глицином и таурином: гликохолевая (m/z 602,20), гликохенодезоксихолевая (m/z 586,21), таурохолевая (m/z 652,19) и таурохенодезоксихолевая кислоты (m/z 636,19). При этом следует отметить, что в гексановых экстрактах из метанольного раствора не было обнаружено хенодезоксихолевой кислоты.



Пределы обнаружения:

- ABA – 230 фмоль (64 пг) на мишени
- JA – 300 пмоль (63 пг) на мишени

В результате жидкостно-жидкостной экстракции перехода фитогормонов в н-гексановую фазу из этанола зафиксировано не было. В случае добавления 0,5 мкг каждого из фитогормонов сигналы, соответствующие $[M-H+Ba]^+$ ионам фитогормонов, были детектированы на уровне, незначительно превышающем химический шум, поэтому, в этом случае н-гексановый экстракт концентрировали в 10 раз, после чего снова анализировали. После концентрирования в масс-спектрах сигналы обоих аналитов были надежно детектированы.

Заключение

- Подход на основе технологии Ленгмюра может быть использован для проведения быстрого скрининга монокарбоновых гидроксикислот в природных и биологических образцах методом МАЛДИ-МС.
- Предел обнаружения по количеству вещества на мишени для литохолевой и холевой кислот составил около 300 фмоль, для урсодезоксихолевой кислоты – 1,5 пмоль, для абсцизовой кислоты – 230 фмоль, для жасмоновой кислоты – 300 фмоль.
- При экстракции желчных кислот из сухой желчи смесью этанола с н-гексаном по результатам МАЛДИ-МС анализа были определены холевая и хенодезоксихолевая кислоты, а также их конъюгаты с глицином и таурином в виде их монокарбоксилатов бария.
- Анализ абсцизовой и жасмоновой кислот в составе природных образцов с использованием оптимизированной методики следует проводить в н-гексановом экстракте из высушенной вытяжки, полученной из растительного материала.