

Определение нуклеозидов в водных растворах методом ГХ-МС в виде триметилсилильных производных.

Андриянов Андрей Владимирович
аспирант

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра аналитической химии*
andriyanov@inbox.ru

Введение

Эндогенный окислительный стресс является наиболее вредоносным процессом, происходящим в клетках, особенно в аспекте старения и заболевания раком. В наибольшей степени действию окислителей подвергаются ДНК и РНК. Наиболее подходящим методом для оценки окислительного стресса ДНК и РНК в организме человека является газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), позволяющая одновременно определять большой набор нормальных и модифицированных нуклеозидов в биологических образцах, что увеличивает достоверность получаемых результатов по сравнению с определением какого-либо одного нуклеозида. Однако, в литературе приводятся факты искажения состава пробы при проведении дериватизации, что происходит в результате длительного нагревания реакционной смеси при повышенной температуре (около 1 часа при 120°C). В данной работе исследуется возможность замены традиционной стадии нагревания при дериватизации нуклеозидов с помощью N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА) выдерживанием реакционной смеси в ультразвуке при комнатной температуре.

Методика эксперимента

Эксперименты проводили на хромато-масс-спектрометре, состоящем из газового хроматографа Trace GC 2000 и масс-спектрометра Automass Multi фирмы "ThermoQuest". Разделение проводили на капиллярной колонке Restek RTX-200ms (неподвижная фаза – трифторпропилметилполисилоксан) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.32 мм и толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм. В качестве газа-носителя применяли гелий марки А. Детектирование масс-спектров проводилось в режиме химической ионизации с регистрацией положительных ионов, в качестве газа-реагента использовали метан.

В качестве модельных соединений использовали аденозин, уридин, ксантозин. Для проведения дериватизации применяли пиридин и N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), содержащий 1% триметилхлорсилана.

Раствор, содержащий определяемые соединения готовили следующим образом: в пузырек на 2 мл помещали навески сухих нуклеозидов и добавляли 1.5 мл пиридина. Концентрации нуклеозидов в растворе составили 1.9×10^{-8} г/мкл для аденозина, 7.3×10^{-8} г/мкл для уридина и 2.4×10^{-8} г/мкл для ксантозина. Для сравнения дериватизации при нагревании с дериватизацией в ультразвуке 50 мкл полученного раствора помещали в пузырек на 2 мл и прибавляли 50 мкл БСТФА. После этого пузырек плотно закрывали. Далее полученную смесь либо выдерживали в ультразвуковой ванне (Branson 220) в течение 10 минут при комнатной температуре либо нагревали при 120°C в течение 40 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Для нахождения оптимального количества БСТФА, необходимого для дериватизации в ультразвуке 50 мкл раствора нуклеозидов в пиридине помещали в пузырек на 2 мл и прибавляли 50 мкл БСТФА. После этого пузырек плотно закрывали. Далее полученную смесь выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 10 минут при комнатной температуре. 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Обсуждение результатов

Изначально была проверена наиболее распространенная в литературе методика определения нуклеозидов в виде триметилсилильных производных, которая включает в себя нагрев реакционной смеси при 120°C в течение 40 минут.

Идентификация пиков на хроматограммах проводилась по их масс-спектрам. Результаты идентификации представлены в табл. 1.

Таблица. 1. Времена удерживания триметилсилильных производных аденозина, уридина и ксантозина.

Производное	Время удерживания, мин
4ТМС-аденозин	18.32
4ТМС-уридин	18.39
5ТМС-ксантозин	18.52
3ТМС-уридин	19.01

Как видно из приведенных данных, при данном способе дериватизации аденозин образует четырехзамещенное производное, ксантозин – пятизамещенное, а уридин – два производных, - четыре- и тризамещенное. В масс-спектрах всех производных наиболее интенсивным пиком является либо пик квазимолекулярного иона $[M+H]^+$ либо пик $[M-15]^+$, который соответствует отрыву во время ионизации одной CH_3 -группы от определяемого вещества.

Далее, после отработки стандартной методики определения нуклеозидов в виде триметилсилильных производных, решили провести дериватизацию без нагревания. Для этого стадию выдерживания реакционной смеси при 120°C в течение 40 минут заменили на обработку данной смеси ультразвуком в течение 10 минут при комнатной температуре. Сравнение площадей пиков квазимолекулярных ионов соответствующих производных, полученных при нагревании и при комнатной температуре представлено в табл.2, 3.

Таблица 2. Площади пиков квазимолекулярных ионов для производных аденозина и ксантозина.

№	4ТМС-аденозин, площадь пика m/z 556 $[M+H]^+$, у.е.		5ТМС-ксантозин, площадь пика m/z 645 $[M+H]^+$, у.е.	
	без нагрева	с нагревом	без нагрева	с нагревом
1	110833	150863	93531	105521
2	134146	113672	99935	90606
3	131305	139082	96267	113720
4	139107	129831	113751	129842
среднее	128848	133362	100871	109922
стандартно е отклонение	12435	15697	8979	16368

Таблица 3. Площади пиков квазимолекулярных ионов для производных уридина.

№	4ТМС-уридин, площадь пика m/z 533 $[M+H]^+$, у.е.		3ТМС-уридин площадь пика m/z 461 $[M+H]^+$, у.е.	
	без нагрева	с нагревом	без нагрева	с нагревом
1	115311	131732	46425	47952
2	110203	82372	47775	45945
3	118899	122307	46854	44493
4	116281	135492	45708	50418
среднее	115174	117976	46691	47202
стандартно е отклонение	3644	24375	864	2571

Анализ площадей пиков квазимолекулярных ионов определяемых соединений (табл. 2, 3) показал, что выход дериватизации как при нагревании, так и при комнатной температуре одинаковый.

Как известно, БСТФА достаточно сильно загрязняет источник ионов масс-спектрометра, поэтому для оптимизации и минимизации количества БСТФА, необходимого для дериватизации провели сравнительный анализ зависимости результатов определения производных нуклеозидов (площадей пиков) от количества введенного в реакционную смесь БСТФА. Соотношение БСТФА/пиридин составляло 1:1, 3:5, 1:5, 1:10, 1:25. Полученные результаты показали, что оптимальным соотношением БСТФА/пиридин в реакционной смеси является 1:5 (v/v).

Выводы

Опираясь на полученные результаты, можно сказать, что традиционную стадию нагревания при дериватизации нуклеозидов с помощью БСТФА для их хромато-масс-спектрометрического определения можно заменить выдерживаем реакционной смеси в ультразвуке при комнатной температуре в течение 10 минут, что существенно сокращает продолжительность определения и упрощает его проведение, а оптимальное соотношение БСТФА/пиридин в реакционной смеси составляет 1:5 (v/v).

Литература

1. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. «Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging», *Proc. Natl Acad. Sci USA*, **90**, 7915-7922 (1993).
2. Dizdaroglu M., «Application of capillary gas chromatography – mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage in DNA: implications for assessing DNA repair processes», *Anal. Biochem.*, **144**, 593-603 (1985).
3. Dizdaroglu M., «Chemical determination of free radical-induced damage to DNA», *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 225-242 (1991).
4. Dizdaroglu M., «Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography – mass spectrometry», *Methods Enzymol.*, **234**, 3-16 (1994).
5. Podmore I.D., Griffiths H.R., Herbert K.E., Mistry N., Mistry P., Lunec J. «Vitamin C exhibits both a pro-oxidant and antioxidant behavior in vivo», *Nature*, **392**, 559 (1998).
6. Rehman A., Collis C.S., Yand M., Kelly M., Diplock A.T., Halliwell B., Rice-Evans C., «The effect of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 293-298 (1998).
7. Cadet J., Douki T., Ravant J.-L. «Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases», *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1034-1039 (1997).
8. Senturker S., Dizdaroglu M. «The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by gas chromatography-mass spectrometry: how many modified bases are involved? Prepurification or not?», *Free Radic. Biol. & Medicine*, **27**, № 3/4 370-380 (1999).
9. Douki T., Delatour T., Bianchini F., Cadet J. «Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method», *Carcinogenesis*, **17**, № 2, 347-353 (1996).
10. Langridge J.L., McClure T.D., El-Shakawi S., Fielding A., Shram K.H., Newton R.P. «Gas chromatography/mass spectrometric analysis of urinary nucleosides in cancer patients; potential of modified nucleosides as tumor markers», *Rap. Comm. Mass Spectrom.*, **7**, 427-434 (1993)