

**БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 615.356;547-3; 571.27  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-2-197-205>

Поступила в редакцию 24.01.2020  
Received 24.01.2020

**А. С. Круглик<sup>1</sup>, Д. В. Цавловский<sup>1</sup>, Т. В. Миранцова<sup>2</sup>, О. Л. Шарко<sup>1</sup>, В. В. Шманай<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,*  
<sup>2</sup>*СООО Хемма-тест, Минск, Беларусь*

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИТОВ ВИТАМИНА D<sub>3</sub>**

**Аннотация.** Описан улучшенный вариант синтеза гаптена на основе холекальциферола и его активного метаболита 25-гидроксиохолекальцеферола. Оптимизирована методика получения высокомолекулярных иммуногенных конъюгатов производных витамина D<sub>3</sub> с бычьим сывороточным альбумином, а также конъюгатов с пероксидазой хрена для прямого ИФА. Проведена иммунизация кроликов, выделены поликлональные антитела к 25-гидроксиохолекальцеферолу, которые испытаны в иммуноферментном анализе. Для повышения точности метода оптимизирован процесс пробоподготовки, включающий высвобождение витамина D<sub>3</sub> и его активных метаболитов из комплексов с витамин D-связывающим белком.

**Ключевые слова:** 25-гидроксиохолекальцеферол, витамин D<sub>3</sub>, биоконъюгация, иммуноферментный анализ, витамин D-связывающий белок

**Для цитирования.** Иммуноферментный анализ метаболитов витамина D<sub>3</sub> / А. С. Круглик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хіміч. навук. – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 197–205. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-546-2-197-205>

**A. S. Kruhlik<sup>1</sup>, Dz. V. Tsaulouski<sup>1</sup>, A. T. Mirancova<sup>2</sup>, O. L. Sharko<sup>1</sup>, V. V. Shmanai<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,*  
*e-mail: a.kruhlik@gmail.com*

<sup>2</sup>*Hemma-test Joint LLC, Minsk, Belarus, e-mail: hemma-test@yandex.ru*

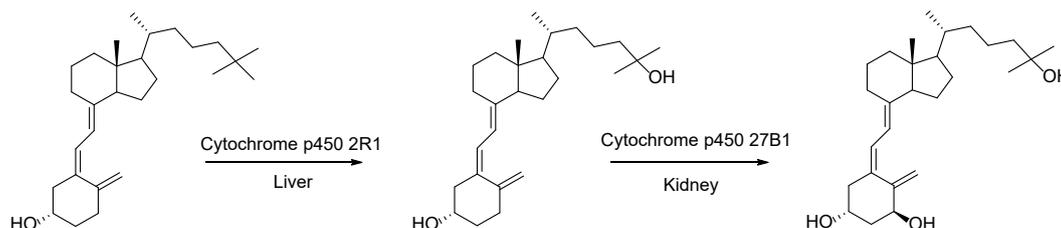
**ENZYME IMMUNOASSAY OF VITAMIN D<sub>3</sub> METABOLITES**

**Abstract.** We report herein improved version of the synthesis of hapten based on cholecalciferol and its active metabolite 25-hydroxycholecalciferol. The methodology of obtaining high-molecular immunogenic conjugates of vitamin D<sub>3</sub> derivatives with bovine serum albumin and horseradish peroxidase conjugates for direct ELISA was optimized. Immunisation of rabbits was carried out and polyclonal antibodies to 25-hydroxycholecalciferol were obtained and tested in an enzyme-linked immunosorbent assay. To improve the accuracy of the method, the sample preparation procedure was optimized, including the release of vitamin D<sub>3</sub> and its active metabolites from complexes with vitamin D-binding protein.

**Keywords:** 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D<sub>3</sub>, bioconjugation, enzyme immunoassay, vitamin D-binding protein

**For citation.** Kruhlik A. S., Tsaulouski Dz. V., Mirancova A. T., Sharko O. L., Shmanai V. V. Enzyme immunoassay of vitamin D<sub>3</sub> metabolites. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2020, vol. 56, no. 2, pp. 197–205 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-546-2-197-205>

**Введение.** Витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол) – жирорастворимый витамин, одна из пяти форм витамина D. В организме человека он отвечает за кальций-фосфорный обмен [1]. Неактивный в нативной форме холекальциферол в организме подвергается последовательному гидроксильрованию под действием ферментов семейства цитохрома P450 с образованием активных метаболитов. В печени под действием CYP2R1 или CYP27A1 образуется 25-гидроксиохолекальцеферол (кальцидиол), который затем гидроксильруется под действием CYP27B1 до 1,25-дигидроксиохолекальцеферола (кальцитриола) преимущественно в почках (рис. 1) [2]. С дефицитом витамина D<sub>3</sub>, помимо рахита, связан целый ряд серьезных заболеваний: сердечно-сосудистые, аутоиммунные, аллергические, некоторые типы рака, диабет и другие хронические заболевания [3–6].

Рис. 1. Последовательное гидроксилирование витамина D<sub>3</sub> в организме человекаFig. 1. The sequential hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> in humans

Поскольку анализ витамина D<sub>3</sub> и его активных метаболитов востребован в основном в практической медицине, к аналитическим методам предъявляются определенные требования в части специфичности определения, простоты и экспрессности. В связи с этим разработанные для научно-исследовательских задач хроматографические процедуры, требующие специального приборного оснащения и сложной пробоподготовки, невозможно адаптировать для клинических лабораторий [7, 8]. Для клинической медицины разработаны эталонные методики измерений витамина D<sub>3</sub> с помощью метода ВЭЖХ и тандемной масс-спектрометрии. Однако на практике оказалось, что метод, будучи ахиральным, не способен разделить 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> и его эпимер 3-эпи-25-гидроксивитамин D<sub>3</sub>. Проблематично также хроматографическое разделение других изобарных структур, например 7- $\alpha$ -гидрокси-4-холестен-3-она – метаболитического предшественника желчных кислот [9]. Авторы утверждают, что вклад данного соединения, не отделенного хроматографически, может завышать результаты измерения витамина D<sub>3</sub> до 39 %.

В клинических условиях контролировать уровень метаболитов витамина D<sub>3</sub> удобно с помощью иммуноферментного анализа, главной составляющей которого являются специфические антитела. Молекула 25-гидроксиколекальцеферола слишком мала, чтобы самостоятельно провоцировать иммунный ответ, поэтому для получения антител в таких случаях используют иммуногенный конъюгат гаптена с белком-носителем [10], в роли которого обычно выступает бычий сывороточный альбумин (БСА).

Одной из самых сложных проблем пробоподготовки при анализе витамина D<sub>3</sub> и его метаболитов является необходимость выделения аналита из прочного комплекса с витамин D-связывающим белком. Для разрушения этого комплекса необходимы дополнительные этапы пробоподготовки, что снижает возможности для использования такого анализа в полевых условиях [8].

**Материалы и оборудование.** В работе использовали N-гидроксисукцинимид (Fluka), БСА (J. T. Baker), 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> (Formosa Laboratories), янтарный ангидрид (Fluka), дициклогексилкарбодиимид (Aldrich), тетраметилбензидин (ТМБ), полный адьювант Фрейнда (ПАФ), неполный адьювант Фрейнда (НАФ) (Aldrich), натрий-фосфатный буфер (НФБ), твин-20, твин-60, твин-80, тритон X-100 лаурилсульфат натрия, цетилпиридиний-N-бромид (Roth); олеиновую кислоту, литохолевую кислоту, дезоксихолиевую кислоту (Aldrich); трис(2-карбок시에тил)фосфин (ТСЕР),  $\beta$ -меркаптоэтанол (Fluka) гидроксид натрия (ч.д.а.), хлорид натрия (х.ч.), сульфат натрия (х.ч.), карбонат натрия (х.ч.), гидрокарбонат натрия (х.ч.), перекись водорода (30 %) ГОСТ 177-88.

Этилацетат, пиридин, ацетон, хлористый метилен, ДМСО, уксусную кислоту, триэтиламин перед работой очищали перегонкой и при необходимости абсолютизировали по стандартным методикам.

Спектры ЯМР регистрировали при 500 МГц (1H) на мультаядерном Фурье-ЯМР-спектрометре высокого разрешения Bruker-Biospin AVANCE-500 в CDCl<sub>3</sub> с калибровкой частот по остаточному сигналу растворителя. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «СОЛАР РВ2201». Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм, для колоночной гель-фильтрации – Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals).

### Экспериментальная часть

**25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> 3-гемисукцинат 2a.** 23 мг (0,057 ммоль) 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> растворили в 1,0 мл пиридина, добавили 75 мг (0,75 ммоль) янтарного ангидрида. Перемешивали при комнатной температуре 5 дней в атмосфере аргона. Охладили до 0 °С, добавили 100 мкл воды

и перемешивали час. Экстрагировали этилацетатом, трижды промыли водой. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, упарили, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом, затем 10 % ацетона в хлористом метиле. Выделили 17 мг (59 %) гемисукцината 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub>. ЯМР спектр соответствует описанному в литературе [11].

**Витамин D<sub>3</sub> 3-гемисукцинат 2b.** 100 мг (0,26 ммоль) витамина D<sub>3</sub> растворили в 1,6 мл пиридина, добавили 309 мг (3,09 ммоль) янтарного ангидрида. Перемешивали при комнатной температуре 5 дней в атмосфере аргона. Охладили до 0 °С, добавили 100 мкл воды и перемешивали час. Экстрагировали этилацетатом, трижды промыли водой. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, упарили, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом, затем 10 % ацетона в хлористом метиле. Выделили 60 мг (48 %) гемисукцината витамина D<sub>3</sub>. ЯМР спектр соответствует описанному в литературе [12].

**N-гидроксисукцинимид 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> 3-гемисукцината 3a.** 25 мг (0,05 ммоль) гемисукцината 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> растворили в 1,0 мл сухого хлористого метилена, добавили 7,6 мг (0,067 ммоль) гидроксисукцинимида и 13,8 мг (0,067 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали в течение ночи. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат разбавили хлористым метиленом до 5,0 мл и трижды промыли водой. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, упаривали, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом. Выделили 19 мг активированного эфира 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> (63 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,54 (3H, с, H-18), 0,93 (3H, д, J = 6,50 Гц, H-21), 1,21 (6H, с, H-26,27), 2,73 (2H, т, J = 7,05, 7,05 Гц, H-28), 2,83 (4H, с, H-30,31), 2,94 (2H, т, J = 7,12, 7,12 Гц, H-29), 4,83 (1H, д, J = 2,39 Гц, H-19Z), 4,99 (1H, м, H-3), 5,06 (1H, д, J = 2,38 Гц, H-19E), 6,02 (1H, д, J = 11,22 Гц, H-7), 6,21 (1H, д, J = 11,28 Гц, H-6).

**N-гидроксисукцинимид витамина D<sub>3</sub> 3-гемисукцината 3b.** 40 мг (0,083 ммоль) гемисукцината витамина D<sub>3</sub> растворили в 2,0 мл сухого хлористого метилена, добавили 12,8 мг (111 ммоль) гидроксисукцинимида и 23 мг (111 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали в течение ночи. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат разбавили хлористым метиленом до 5,0 мл и трижды промыли водой. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, упарили, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом. Выделили 20 мг активированного эфира витамина D<sub>3</sub> (41 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,54 (3H, с, H-18), 0,86 (6H, дд, J = 6,5, 2,3 Гц, H-26,27) 0,93 (3H, с, J = 6,47 Гц, 21-H), 2,73 (2H, т, J = 7,05, 7,05 Гц, H-28), 2,83 (4H, с, H-30,31), 2,95 (2H, т, J = 7,12 Гц, H-29) 4,83 (1H, д, J = 2,39 Гц, H-19Z), 4,99 (1H, м, H-3), 5,06 (1H, д, J = 2,41 Гц, H-19E), 6,02 (1H, д, J = 11,26 Гц, H-7), 6,21 (1H, д, J = 11,23 Гц, H-6).

**Оптимизация условий ковалентной конъюгации витамина D<sub>3</sub> с бычьим сывороточным альбумином 4b.** К растворам 1,75 мг (26,3 нмоль) БСА в 200 мкл 0,4 N NaHCO<sub>3</sub>, охлажденным до 0 °С, медленно добавили 180/360/720 мкг (300/600/900 нмоль) N-гидроксисукцинимид витамина D<sub>3</sub> 3-гемисукцината **3b** в 200 мкл органического растворителя (табл. 1) и перемешивали 2 ч, затем оставили на 12 ч при +4 °С. После этого очищали от низкомолекулярных примесей гелефильтрацией, элюируя 0,1 M TEAA pH 8,2.

Таблица 1. Оптимизация условий ковалентной конъюгации витамина D<sub>3</sub> с бычьим сывороточным альбумином

Table 1. Optimization of covalent conjugation of vitamin D<sub>3</sub> with bovine serum albumin

Показатель	Количество <b>3b</b> , экв		
	10	20	40
Органический растворитель	Среднее количество введенных модификаций <i>n</i> , экв		
ДМСО	3,8	11,2	20,0
ДМСО-Твин-20	5,4	12,2	20,2
N-метилпирролидон	4,2	11,7	22,3

**Ковалентная конъюгация 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> с бычьим сывороточным альбумином 4а.** К раствору 30 мг (0,45 мкмоль) БСА в смеси 1,5 мл 0,4 N NaHCO<sub>3</sub> и 1,4 мл ДМСО, охлажденному до 0 °С, добавили 13,5 мг (22,6 мкмоль) N-гидроксисукцинимид 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> 3-гемисукцината **3а** в 100 мкл ДМСО и перемешивали 2 ч, затем оставили на 12 ч при +4 °С. После этого очищали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией, элюируя 0,1 М ТЕАА рН 8,2.

**Ковалентная конъюгация 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> с пероксидазой из корня хрена 4с.** К раствору 2 мг (45,5 нмоль) ПХ в смеси 250 мкл 0,4 N NaHCO<sub>3</sub> и 200 мл ДМСО, охлажденному до 0 °С, добавили 135 мкг (230 нмоль) N-гидроксисукцинимид 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> 3-гемисукцината в 50 мкл ДМСО и перемешивали 2 ч, затем оставили на 12 ч при +4 °С. После этого очищали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией, элюируя 0,1 М ТЕАА рН 8,2.

**Витамина D<sub>3</sub> 3-паранитробензоат 5b.** 150 мг (0,39 ммоль) витамина D<sub>3</sub> **1а** растворили в 1 мл хлористого метилена, охладили до 0 °С, добавили 116 мг (0,58 ммоль) нитрофенил хлорформиата, 100 мкл (1,24 ммоль) пиридина и 25 мг (0,21 ммоль) ДМАР. Перемешивали при 0 °С 24 ч, после чего делили на колонке с силикагелем, элюируя смесью ПЭ-толуол. Выделили 90 мг (42 %) паранитробензоата витамина D<sub>3</sub>.

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,54 (3H, с, H-18), 0,86 (6H, дд, J = 6,5, 2,3 Гц, H-26,27) 0,93 (3H, с, J = 6,47 Гц, 21-H), 4,83 (1H, д, J = 2,39 Гц, H-19Z), 4,99 (1H, м, H-3), 5,06 (1H, д, J = 2,41 Гц, H-19E), 6,02 (1H, д, J = 11,26 Гц, H-7), 6,21 (1H, д, J = 11,23 Гц, H-6), 7,38 (2H, дд, Ar), 8,27 (2H, дд, Ar).

**Витамина D<sub>3</sub> 3-(N-метиламиномасляной кислоты эфир) 6b.** 15 мг (29,7 мкмоль) пара-нитробензоата витамина D<sub>3</sub> **5b** растворили в 2 мл хлористого метилена, добавили 9,2 мкл (66,8 мкмоль) триэтиламина, 7 мг (44,5 ммоль) гидрохлорида N-метиламиномасляной кислоты и 5 мг (42 мкмоль) ДМАР. Перемешивали при комнатной температуре 24 ч, после чего отфильтровали осадок, и делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом с градиентом этанола. Выделили 13 мг (85 %) витамина D<sub>3</sub> 3-(N-метиламиномасляной кислоты эфира).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,54 (3H, с, H-18), 0,86 (6H, дд, J = 6,5, 2,3 Гц, H-26,27) 0,93 (3H, с, J = 6,47 Гц, 21-H), 2,90 (2H, м, H-28), 3,30 (3H, м, H-32), 4,83 (1H, д, J = 2,39 Гц, H-19Z), 4,99 (1H, м, H-3), 5,06 (1H, д, J = 2,41 Гц, H-19E), 6,02 (1H, д, J = 11,26 Гц, H-7), 6,21 (1H, д, J = 11,23 Гц, H-6), 7,38 (2H, дд, Ar), 8,27 (2H, дд, Ar).

**N-гидроксисукцинимид витамина D<sub>3</sub> 3-(N-метиламиномасляной кислоты эфир) 7b.** 10 мг (18,5 мкмоль) витамина D<sub>3</sub> 3-(N-метиламиномасляной кислоты эфира) **6b** растворили в 2 мл хлористого метилена, добавили 2,6 мг (22 мкмоль) гидроксисукцинимид и 4,7 мг (22 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали ночь. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат разбавили хлористым метиленом до 5 мл и трижды промыли водой. Органический слой сушили безводным сульфатом натрия, упарили, остаток делили на колонке с силикагелем, элюируя хлористым метиленом. Выделили 5,4 мг активированного эфира витамина D<sub>3</sub> (47 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,54 (3H, с, H-18), 0,86 (6H, дд, J = 6,5, 2,3 Гц, H-26,27) 0,93 (3H, с, J = 6,47 Гц, 21-H), 2,87 (4H, с, H-34, 35), 2,93 (2H, м, H-28), 3,30 (3H, м, H-32), 4,82 (1H, д, J = 2,39 Гц, H-19Z), 4,99 (1H, м, H-3), 5,05 (1H, д, J = 2,41 Гц, H-19E), 6,02 (1H, д, J = 11,26 Гц, H-7), 6,21 (1H, д, J = 11,23 Гц, H-6).

**Иммунизация.** Группу из пяти кроликов иммунизировали конъюгатом 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> с БСА. Каждому кролику вводили подкожно в 5–7 точек спины 1 мг конъюгата **4а**, растворенного в 0,5 мл НФБ (0,1М, рН 7,4), содержащего 0,1 % NaCl и эмульгированного в равном объеме полного адьюванта Фрейнда. Интервалы между инъекциями составляли 2–4 недели. Иммунизацию продолжали в течение 6 мес., осуществляя периодический отбор проб крови из краевой вены уха животных. Полученные образцы сыворотки тестировали на наличие связывающей способности в отношении меченых пероксидазой антигенов, определяли их титры (рабочее разведение) в твердофазной иммуноаналитической системе. В дальнейшей работе использовали антисыворотку с титром 1 : 50 000.

**Проведение ИФА.** В лунки полистирольных планшетов вносили по 150 мкл раствора антител овцы к иммуноглобулинам кролика. Планшеты инкубировали в течение 20–24 ч при 4 °С. Затем удаляли содержимое, промывали НФБ (0,1М, рН 7,4), содержащим 0,1 % NaCl и 0,05 % Твин-20 (4×150 мкл).

Затем в лунки планшетов вносили по 150 мкл раствора антисыворотки к 25-гидроксивитамину D<sub>3</sub> в разведении 1: 50 000 и инкубировали в течение 20–24 ч.

Для проведения анализа в лунки планшетов вносили по 50 мкл раствора калибровочных проб и анализируемых образцов в дубликатах и по 100 мкл раствора конъюгата с пероксидазой хрена, инкубировали лунки 2 ч при 37 °С, затем удаляли содержимое, промывали, как описано выше, и добавляли 150 мкл хромоген-субстратного буфера и инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Останавливали реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл раствора стоп-реагента (5 %-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Измеряли оптическую плотность раствора во всех лунках при 450 нм. Результаты анализа рассчитывали методом интерполяции по калибровочной кривой. Строили для калибровочных проб график зависимости В/В<sub>0</sub>, % от концентрации 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> в калибровочных пробах (нмоль/л). По калибровочному графику определяли содержание 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> в исследуемых образцах.

**Оптимизация пробоподготовки образцов с матриксом для ИФА.** Анализируемые образцы: НФБ с рН 7,4 (ноль) или раствор 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> с концентрацией 500 нМ в фосфатном буферном растворе с рН 7,4 (нагрузка). Вносили в образцы ПАВ (Твин-20, Твин-60, Твин-80, Тритон-Х100, лаурилсульфат натрия, цетилпиридиний-N-бромид, олеиновую, литохоловую и дезоксихолевую кислоты) до конечной концентрации 0,1 %; инкубировали в течение ночи при 20 °С.

Анализируемые образцы с использованием сыворотки крови в качестве матрикса добавляли к сыворотке НФБ с рН 7,4 (В<sub>0</sub>) или раствор 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> с концентрацией 500 нМ в НФБ с рН 7,4 (В), инкубировали 3 ч. После этого 1) вносили в образцы сыворотки смесь из ПАВ (Тритон-Х100, лаурилсульфат натрия или литохоловая кислота) и восстанавливающего агента (ТСЕР или β-меркаптоэтанол 0,1 %); инкубировали 18 ч при 20 °С или 5 мин при 95 °С; 2) вносили в образцы сыворотки раствор трипсина до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 18 ч при 20 °С, или до конечной концентрации 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С, после чего добавляли эквивалентное количество соевого ингибитора трипсина и инкубировали 30 мин; 3) заменяли НФБ с рН 7,4 для разбавления сыворотки 0,1 М триэтиламмоний ацетатным буфером с рН 4,0 или 0,1 М карбонатным буфером с рН 10,7; 4) заменяли НФБ с рН 7,4 для разбавления сыворотки 0,1 М триэтиламмоний ацетатным буфером с рН 4,0 или 0,1 М карбонатным буфером с рН 10,7, вносили в образцы сыворотки раствор трипсина до конечной концентрации 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С, после чего добавляли эквивалентное количество соевого ингибитора трипсина и инкубировали 30 мин. Все образцы анализировали с помощью ИФА по описанному ранее протоколу.

**Результаты и их обсуждение.** Для получения специфических антител необходимо синтезировать иммуногенные конъюгаты гаптена с белком-носителем. Нами был осуществлен синтез активированного эфира 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> **3a** с использованием сукцинатной линкерной группы по схеме, представленной на рис. 2. Учитывая высокую стоимость 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub>, оптимизацию условий конъюгации с белком носителем проводили на доступном витамине D<sub>3</sub>. Для этого было синтезировано активированное производное витамина D<sub>3</sub> **3b**. В отличие от описанного ранее подхода [11] нами были выделены с помощью колоночной хроматографии и охарактеризованы

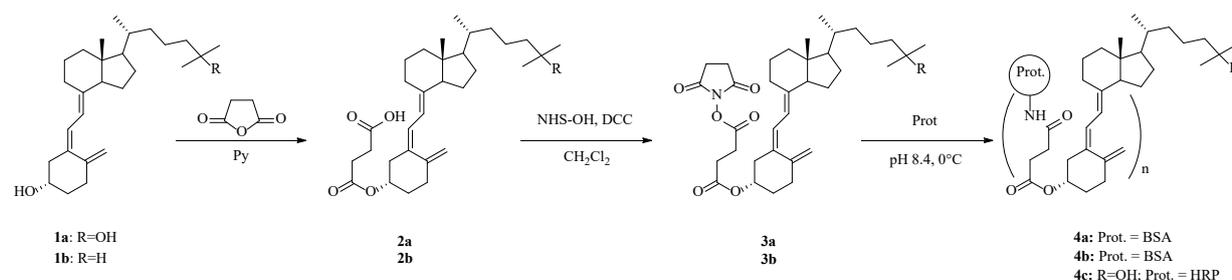


Рис. 2. Схема синтеза конъюгатов БСА с 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> 3-гемисукцинатом и витамином D<sub>3</sub> 3-гемисукцинатом

Fig. 2. Synthesis of conjugates of BSA with 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 3-hemisuccinate and vitamin D<sub>3</sub> 3-hemisuccinate

активированные производные **3a** и **3b**. Использование хроматографически чистых индивидуальных реагентов позволило увеличить степень конъюгации гаптенов с белком-носителем.

Так как витамин  $D_3$  и его производные гидрофобны, конъюгацию с белком-носителем **4b** вели в смеси водного буфера и органического растворителя в соотношении 1:1. В качестве органической составляющей реакционной смеси мы использовали ДМСО, ДМСО с добавлением 0,1 % Твин-20 и N-метилпирролидон. Состав конъюгата в смеси буфер-ДМСО определяли по спектрам поглощения (табл. 1). Серия конъюгатов в ДМСО была дополнительно охарактеризована с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с МАЛДИ-ионизацией. Показано, что независимо от органической составляющей реакционной смеси, конъюгация проходила примерно на 50 %. В качестве растворителя для проведения конъюгации был выбран ДМСО как наиболее биосовместимый.

Для получения антител оптимальной считается загрузка на уровне 15–30 молекул гаптена на молекулу белка [13]. Исходя из полученной ранее зависимости, мы вводили в конъюгацию с БСА 50 эквивалентов активированного производного 25-гидроксивитамина  $D_3$  **3a** в смеси водного буфера и ДМСО в соотношении 1:1. Спектр поглощения конъюгата **4a** представлен на рис. 3. Дополнительно содержание гаптена на белке-носителе оценивали по данным масс-спектров. В результате удалось получить конъюгат со средним числом введенных модификаций 27 молекул гаптена на 1 молекулу белка. По аналогичной схеме нами был получен конъюгат 25-гидроксивитамина  $D_3$  с пероксидазой хрена, который использовали для определения 25-гидроксивитамина  $D_3$  в образцах при помощи прямого ИФА (рис. 4). Состав конъюгата определялся по спектру поглощения и составил 1 молекулу витамина на молекулу белка, что является оптимальным для проведения ИФА. Чтобы повысить устойчивость активированной формы гаптена, а также конъюгатов гаптена с белками, нами был предложен гаптен структуры **7b**, где сложноэфирная связь заменена карбаматной, и осуществлен его синтез (рис. 5).

Для уменьшения влияния витамин D-связывающего белка на проведение анализа мы провели оптимизацию процедуры пробоподготовки. Главная задача – разрушить комплекс белка с витамином, который не способен участвовать в конкуренции с пероксидазным конъюгатом во время иммунной реакции. Мы использовали несколько подходов. Первый заключался в вытеснении

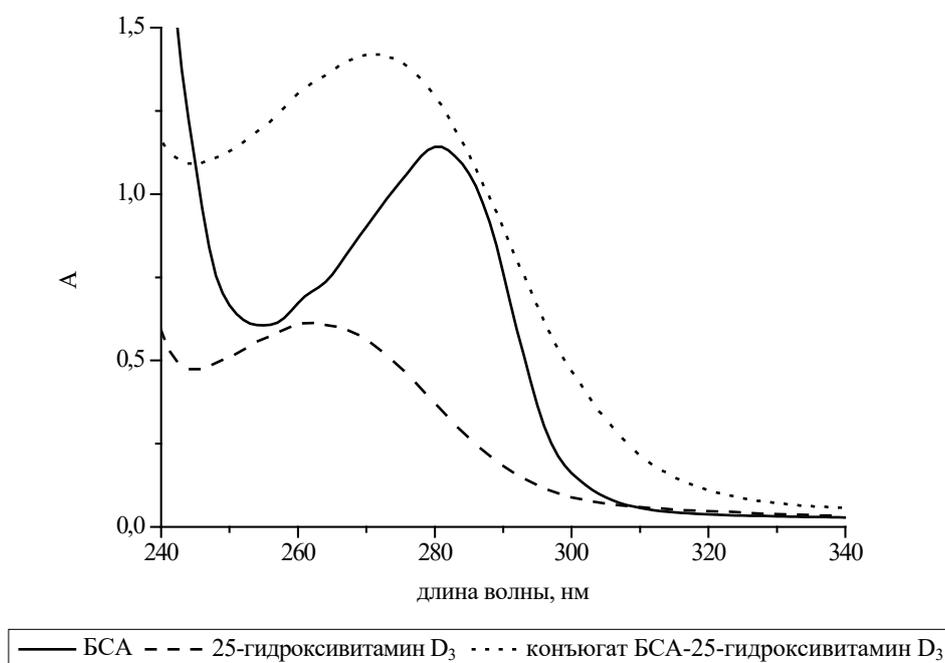


Рис. 3. Уф-спектры БСА, 25-гидроксивитамина  $D_3$  3-гемисукцината, конъюгата 25-гидроксивитамина  $D_3$  3-гемисукцината с БСА

Fig. 3. UV-spectra of BSA, 25-hydroxyvitamin  $D_3$  3-hemisuccinate, conjugate of 25-hydroxyvitamin  $D_3$  3-hemisuccinate with BSA

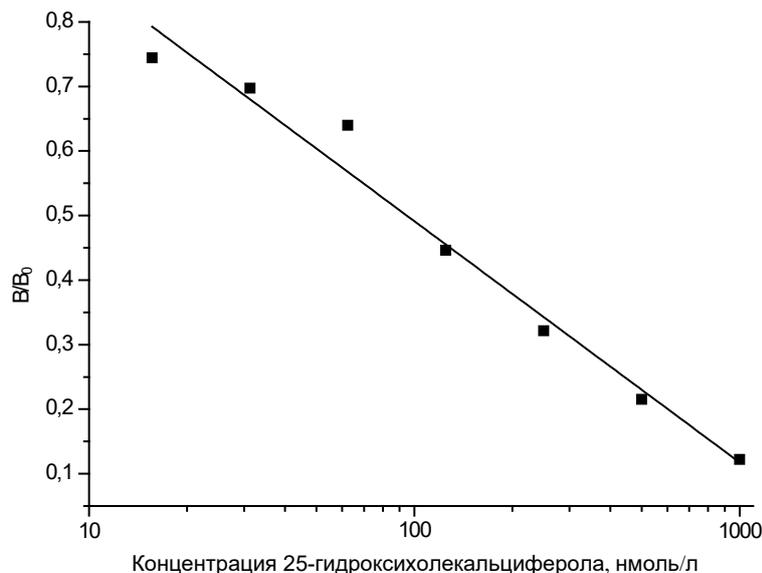


Рис. 4. Калибровочный график прямого ИФА 25-гидроксиголекальциферола с поликлональными антителами

Fig. 4. Calibration curve of direct 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> ELISA with polyclonal antibody

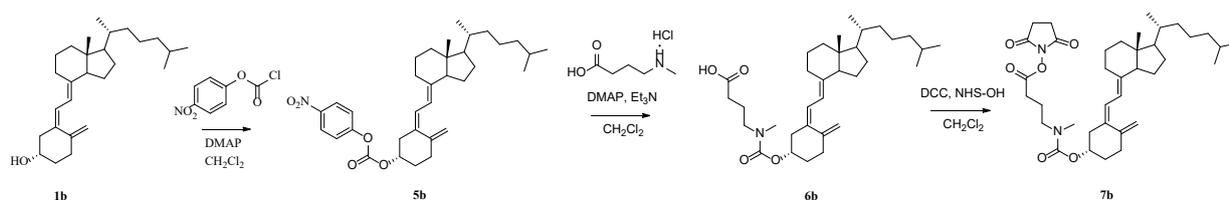


Рис. 5. Схема синтеза активированного производного витамина D<sub>3</sub> с альтернативным линкером

Fig. 5. Synthesis of activated derivative of vitamin D<sub>3</sub> with alternative linker

витамина из комплекса с помощью ПАВ или веществ со структурой, схожей с витамином D, которые могли бы конкурировать с ним за связывание с белком, образуя более прочные комплексы. Второй подход предполагал изменение конформации самого белка за счет изменения pH среды, использования восстанавливающих агентов, температурной обработки или трипсинолиза. Эффективность воздействия оценивали по соотношению  $B/B_0$  и абсолютному значению B (табл. 2). По отдельности лучших результатов удалось добиться с использованием тритона X-100 и литохоловой кислоты, а также термического воздействия, изменения pH для иммунной реакции и трипсинолиза. В комбинации эффективнее всего оказалось использования буфера с pH 4 (т. е. переход

Таблица 2. Оптимизация условий пробоподготовки образцов для ИФА

Table 2. Optimization of sample preparation conditions procedure for ELISA

Условия пробоподготовки	$B/B_0$	$B_0$ , о.е.
Буферная модель	0,19	0,89
Без пробоподготовки	0,81	0,99
Тритон X-100, 0,1 %; +20 °C	0,43	0,54
Тритон X-100, 0,1 %; +95 °C	0,39	0,48
Литохоловая кислота, 0,1 %; +20 °C	0,58	0,72
Литохоловая кислота, 0,1 %; +95 °C	0,58	0,72
0,1M ТЕАА pH 4,0	0,56	1,84
0,1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 10,7	0,42	0,82
Трипсин 10 мг/мл, +37 °C	0,50	0,83
Трипсин 10 мг/мл, +37 °C, 0,1M ТЕАА pH 4,0	0,44	1,00

через изоэлектрическую точку витамин D-связывающего белка) в присутствии трипсина с умеренной температурной обработкой (+37 °C).

**Заключение.** Синтезированы активированные производные витамина D<sub>3</sub> и его активного метаболита 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> для проведения конъюгации с белковыми молекулами. Подобраны оптимальные условия для получения белковых конъюгатов (50 % содержание органического растворителя в реакционной смеси и двукратный избыток гаптена) для иммунизации и проведения ИФА. Иммунизация кроликов синтезированными конъюгатами позволила получить поликлональные антитела, обладающие специфичностью к метаболитам витамина D<sub>3</sub> в прямом иммуноферментном анализе. Предложена схема синтеза активированных производных витамина D<sub>3</sub>, обладающих повышенной устойчивостью. Подобраны условия для уменьшения влияния матрикса на ИФА.

**Благодарности.** Выражаем благодарность доктору Кристоферу Вайзе (Свободный Университет, Берлин) за помощь в регистрации и интерпретации масс-спектров.

**Acknowledgements.** We thank Dr. Cristhop Weise (Freie Universität Berlin) for assistance in obtaining and interpreting the mass-spectra.

### Список использованных источников

1. Vitamin D insufficiency / T. D. Thacher [et al.] // *Mayo Clin Proc.* – 2011. – Vol. 86. – P. 50–60. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0567>
2. Lack of transferability between different immunoassays and LC-MS/MS for total 25- hydroxyvitamin D measurement and disagreement defining deficiency / I. A. Ajuria-Morente [et al.] // *Scand J. Clin. Lab. Inv.* – 2013. – Vol. 73. – P. 82–86. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.743165>
3. Extraskeletal effects and manifestations of Vitamin D deficiency / R. K. Visweswaran [et al.] // *Indian J. Endocrinol Metab.* – 2013. – Vol. 17. – P. 602–610. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.113750>
4. Vitamin D serum levels are associated with cardiovascular outcome in coronary artery disease / G. Siasos [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2013. – Vol. 168. – P. 4445–4447. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.151>
5. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation / W. B. Grant [et al.] // *Cancer.* – 2002. – Vol. 94. – P. 1867–1875. <https://doi.org/10.1002/cncr.10427>
6. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States / D. M. Freessman [et al.] // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2007. – Vol. 99. – P. 1594–1602. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm204>
7. Carter, G. D. 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte / G. D. Carter // *Clinical Chemistry.* – 2012. – Vol. 88. – P. 486–488. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.180562>
8. Davey, R. X. Vitamin D-binding protein as it is understood in 2016: is it a critical key with which to help to solve the calcitriol conundrum? / R. X. Davey // *Annals of Clinical Biochemistry.* – 2017. – Vol. 54. – P. 199–208. <https://doi.org/10.1177/0004563216677100>
9. Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars / I. Shan [et al.] // *Nutr J.* – 2011. – Vol. 10, N 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-46>
10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G / E. Engvall [et al.] // *Immunochemistry.* – 1971. – Vol. 8. – P. 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
11. Production and specificity of antisera raised against 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-[C-3]-bovine serum albumin conjugates / N. Kobayashi [et al.] // *Steroids.* – 1992. – Vol. 57, N 10. – P. 488–493. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0039-128x(94)90009-4)
12. Potential use of cholecalciferol polyethylene glycol succinate as a novel pharmaceutical additive / H. Z. Zhao [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2008. – Vol. 84A, N 4. – P. 954–964. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31402>
13. Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules / K. V. Singh [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 2004. – Vol. 15. – P. 168–173. <https://doi.org/10.1021/bc034158v>

### References

1. Thacher T. D., Clarke B. L. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clinic Proceedings*, 2011, vol. 86, pp. 50–60. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0567>
2. Ajuria-Morente I., Mar-Medina C., Bereciartua-Urbieta E., Izquierdo-Quirce F., Valladares-Gómez C., Crespo-Picot E., Jaume T. Lack of transferability between different immunoassays and LC-MS/MS for total 25- hydroxyvitamin D measurement and disagreement defining deficiency. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2013, vol. 73, pp. 82–86. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.743165>
3. Visweswaran R. K., Lekha H. Extraskeletal effects and manifestations of Vitamin D deficiency. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2013, vol. 17, pp. 602–610. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.113750>
4. Siasos G., Tousoulis D., Oikonomou E., Maniatis K., Kioufisis S., Kokkou E., Miliou A., Zaromitidou M., Kassi E., Stefanadis C. Vitamin D serum levels are associated with cardiovascular outcome in coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, 2013, vol. 168, pp. 4445–4447. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.151>
5. Grant, W. B. An estimate of premature cancer mortality in the U. S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation. *Cancer*, 2002, vol. 94, pp. 1867– 1875. <https://doi.org/10.1002/cncr.10427>

6. Freedman D. M, Looker A. C., Chang S. C., Graubard B. I. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007, vol. 99, pp. 1594–1602. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm204>
7. Carter, G. D. 25-Hydroxyvitamin D: A Difficult Analyte. *Clinical Chemistry*, 2012, vol. 88, pp. 486–488. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.180562>
8. Davey R. X. Vitamin D-binding protein as it is understood in 2016: is it a critical key with which to help to solve the calcitriol conundrum? *Annals of Clinical Biochemistry*, 2017, vol. 54, pp. 199–208. <https://doi.org/10.1177/0004563216677100>
9. Shah I., James R., Barker J., Petroczi A., Naughton D. P. Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutrition Journal*, 2011, vol. 10, no. 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-46>
10. Engval E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, vol. 8, pp. 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
11. Kobayashi N., Takama, Shiomura K., Tabata Y., Takagi K., Shimada K. Production and specificity of antisera raised against 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-[C-3]-bovine serum albumin conjugates. *Steroids*, 1992, vol. 57, no. 10, pp. 488–493. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0039-128x(94)90009-4)
12. Zhao H. Z., Tan E. C., Yung L. Y. L. Potential use of cholecalciferol polyethylene glycol succinate as a novel pharmaceutical additive. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, vol. 84A, no. 4, pp. 954–964. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31402>
13. Singh, K. V. Kaur J, Varshney G. C., Raje M., Suri C. R. Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, vol. 15, pp. 168–173. <https://doi.org/10.1021/bc034158v>

### Информация об авторах

*Крулик Александр Сергеевич* – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

*Цавловский Дмитрий Валентинович* – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tsaulouski@gmail.com

*Шарко Ольга Леонидовна* – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olsharko@gmail.com

*Шманай Вадим Владимирович* – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

*Миранцова Татьяна Валентиновна* – сотрудник. ООО Хемма-тест, Минск, Республика Беларусь. E-mail: hemma-test@yandex.ru

### Information about the authors

*Aliaksandr S. Kruhlik* – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

*Dzmitry V. Tsaulouski* – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tsaulouski@gmail.com

*Olga L. Sharko* – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olsharko@gmail.com

*Vadim V. Shmanai* – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

*Tatsiana V. Mirantsova* – Researcher. Hemma-test Joint LLC, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: hemma-test@yandex.ru